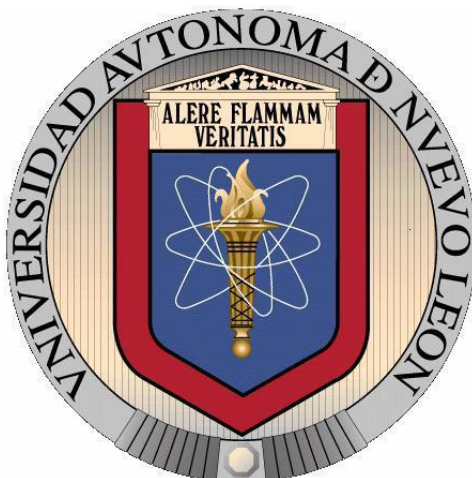


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**Evaluación Preclínica *In Vivo* del Efecto Condrogénico de un Implante  
Construido a Partir de Células Madre Mesenquimales Modificadas  
Genéticamente y Cartílago Natural**

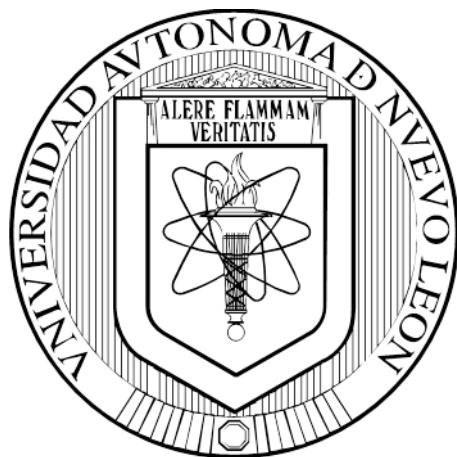
**PRESENTA**

**L.B.G. NANCY RIVERA BOLAÑOS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**ENERO, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**Evaluación Preclínica *In Vivo* del Efecto Condrogénico de un  
Implante Construido a Partir de Células Madre Mesenquimales  
Modificadas Genéticamente y Cartílago Natural.**

**PRESENTA:**

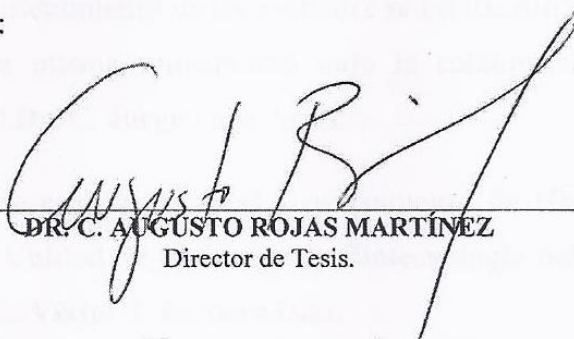
**NANCY RIVERA BOLAÑOS**

Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con  
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

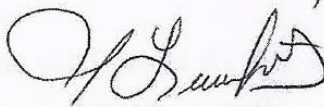
Enero, 2016

**Evaluación Preclínica *In Vivo* del Efecto Condrógeno de un Implante Construido a Partir de Células Madre Mesenquimales Modificadas Genéticamente y Cartílago Natural.**

Aprobación de la tesis:



**DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Director de Tesis.



**DRA. C. LIZETH ALICIA FUENTES MERA**  
Co-Directora de Tesis.



**DR. JORGE LARA ARIAS.**  
Miembro de Tesis.



**DRA. med. RAQUEL GARZA GUAJARDO.**  
Subdirector de Estudios de Posgrado.

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); bajo la dirección del Dr. C. Augusto Rojas Martínez y la co-dirección de la Dr. C. Lizeth Fuentes Mera.**

**Las cirugías, seguimiento y mantenimiento de los animales se realizaron en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma universidad bajo la colaboración y asesoría del M.V.Z Adalberto Ábrego Guerra y del Dr. C. Jorge Lara Arias.**

**Los ensayos de histoquímica se realizaron en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y en la Unidad de Bioimagen y Biotecnología del CIDICS, contando con la colaboración y asesoría del M.C. Víktor J. Romero Díaz.**

**Este trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina bajo el código BI12-002. Cuenta con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de la convocatoria S0008-2009-1.**

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, porque ha guiado mis pasos desde pequeña, por acompañarme y proveer siempre de todo lo que he necesitado.

A mi **Familia**, por estar siempre conmigo y apoyarme en todas las decisiones que he tomado.

A mi asesor el **Dr. Augusto Rojas**, por darme la oportunidad de entrar a su equipo de trabajo y formar parte de este proyecto, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

A la **Dr. C. Lizeth Fuentes**, por su amistad y asesoría constantes, por estar dispuesta a ayudarme y aconsejarme en todo momento.

Al **Dr. C. Jorge Lara**, por su apoyo incondicional a lo largo de este proyecto, por su compromiso en todas las cirugías que realizamos y por compartir el conocimiento y la pasión que siente por los animales.

Al **M.C. Víktor Romero**, por todos sus consejos y valiosas enseñanzas durante tantas horas de trabajo en conjunto, por convertirse en un mentor para mí.

Al **Dr. C. Iván Marino** y al personal del departamento de Patología de la FM-UANL, por su valiosa colaboración.

Al **Dr. Adalberto Ábrego** y a todo el personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por toda la asistencia brindada.

A la **Dr. C. Herminia Martínez**, por las atenciones que tuvo conmigo y por brindarme siempre su apoyo.

A la **Dr. C. Gissela Borrego**, por sus enseñanzas pero especialmente por su amistad.

A las **M.C. Nidia Moncada** y **M.C.P. Alejandra Galván** por toda su ayuda, por resolver mis dudas siempre con paciencia y estar dispuestas a compartir sus experiencias conmigo.

A los estudiantes **Francisco, Iván, Daizha, Paulina, Samantha y Søren** por sus aportaciones en las diferentes etapas de este proyecto.

A mis compañeros **Alex, Gustavo, Kevin, Irene, Armando, Flora, Liz, Luis, Abi y Elvis**, por todo lo que compartimos dentro y fuera de clases.

A quienes forman parte de las **Unidades de Genómica y Terapias Experimentales del CIDICS** y del laboratorio de **Terapia Génica** del departamento de **Bioquímica**, especialmente a Fátima, Cecy, Aleikis, Marcela, Claudia, Carlos, Humberto, Selem, Vanessa, Pamela, Alex, Andrea y Katia.

A **Juany, Ariadna, Normita, Cristy, Irasema, Don Lalo** y a todo el personal del departamento de bioquímica por todo el apoyo que me brindaron siempre.

A **CONACYT**, por contribuir financieramente para el desarrollo de este proyecto.

A todos quienes participaron para que este proyecto saliera adelante.

## DEDICATORIA

A mi **Familia** (papá, mamá, Clemente y Jorge), las personas que le dan sentido a mi vida y que han sido mis pilares; porque a pesar de la distancia siempre han estado ahí, enseñándome que el amor tiene muchas formas de demostrarse.

A mi **Papá**, mi ejemplo a seguir, gracias por haber sembrado en mí el amor por la ciencia, por enseñarme a tener por mi profesión pasión y respeto y por haberme impulsado a darle rienda suelta a mis sueños.

A mi **Mamá**, mi más grande consejera y amiga, gracias por tu presencia y apoyo cuando más lo he necesitado; contigo aprendí lo que es el amor incondicional.

A mis hermanos **Clemente y Jorge**, por su complicidad y camaradería, gracias por ser una parte tan importante en mi vida y apoyarme en cada una de las etapas que hemos compartido juntos.

A **Laura y Neli**, gracias porque durante estos años donde nuestra amistad se ha convertido en hermandad me han acompañado en todo momento.

**TABLA DE CONTENIDO**

|   |            |
|---|------------|
| <b>LISTA DE TABLAS</b>                      | <b>i</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                     | <b>ii</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                | <b>iii</b> |
| <b>RESUMEN</b>                              | <b>iv</b>  |
| <b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>             | <b>1</b>   |
| <b>CAPÍTULO II. ANTECEDENTES</b>            |            |
| 2.1 Cartílago articular                     | 2          |
| 2.1.1 Condrocitos                           | 2          |
| 2.1.2 Matriz extracelular                   | 4          |
| 2.1.2.1 Componente líquido                  | 4          |
| 2.1.2.2 Colágeno                            | 4          |
| 2.1.2.3 Proteoglicanos                      | 4          |
| 2.1.2.4 Glicoproteínas                      | 5          |
| 2.1.3 Organización tisular                  | 5          |
| 2.2 Alteraciones en el tejido cartilaginoso | 6          |
| 2.2.1 Tratamiento de lesiones en el CA      | 7          |
| 2.2.2 Ingeniería de tejidos                 | 8          |
| 2.2.2.1 Componentes celulares               | 8          |
| 2.2.2.1.1 Condrocitos                       | 8          |
| 2.2.2.1.2 Células madre mesenquimales       | 9          |
| 2.2.2.2 Biomoléculas                        | 10         |
| 2.2.2.2.1 Terapia génica                    | 11         |
| 2.2.2.3 Sistema de andamiaje                | 12         |
| 2.3 Modelos animales                        | 13         |
| 2.4 Antecedentes directos                   | 14         |
| <b>CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN</b>          | <b>16</b>  |
| <b>CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS</b>               | <b>17</b>  |
| <b>CAPÍTULO V. OBJETIVO GENERAL</b>         | <b>18</b>  |
| <b>CAPÍTULO VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>   | <b>19</b>  |
| <b>CAPÍTULO VII. ESTRATEGIA GENERAL</b>     | <b>20</b>  |

**CAPÍTULO VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 8.1 Material Biológico     | 21 |
| 8.2 Materiales y Reactivos | 21 |
| 8.3 Equipos                | 24 |
| 8.4 Métodos                | 25 |

**CAPÍTULO IX. RESULTADOS**

|  |    |
|--|----|
| 9.1 Producción adenoviral  | 32 |
| 9.2 Producción y descelularización de la MCB                             | 33 |
| 9.3 Aislamiento y cultivo de CMM a partir de tejido adiposo              | 34 |
| 9.4 Maduración <i>in vitro</i> del implante                              | 35 |
| 9.5 Producción <i>in vitro</i> de IGF-1                                  | 35 |
| 9.6 Cirugías de implantación   | 35 |
| 9.7 Toxicidad derivada del uso del vector adenoviral en el modelo animal | 37 |
| 9.8 Análisis macroscópico de las lesiones                                | 38 |

**CAPÍTULO X. DISCUSIÓN** 40**CAPÍTULO XI. CONCLUSIONES** 43**CAPÍTULO XII. PERSPECTIVAS** 44**CAPÍTULO XIII. BIBLIOGRAFÍA** 45**CAPÍTULO XIV. ANEXOS**

|  |    |
|--|----|
| 14.1 ANEXO 1. Medios de cultivo y soluciones | 51 |
| 14.2 ANEXO 2. Técnicas                       | 52 |



**LISTA DE TABLAS**

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> | Uso de algunos factores de crecimiento y de transcripción en el tratamiento de lesiones articulares | <b>10</b> |
| <b>Tabla 2.</b> | Distribución de los animales en cada uno de los tres grupos experimentales                          | <b>24</b> |
| <b>Tabla 3.</b> | Características de los primers empleados en el estudio  | <b>30</b> |
| <b>Tabla 4.</b> | Perfiles de función hepática y biometrías hemáticas   | <b>37</b> |

**LISTA DE FIGURAS**

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b>  | Corte histológico del CA  | <b>2</b>  |
| <b>Figura 2.</b>  | Elementos de la MEC sintetizados por los condrocitos  | <b>3</b>  |
| <b>Figura 3.</b>  | Zonas del CA  | <b>5</b>  |
| <b>Figura 4.</b>  | Lesión superficial del cartílago  | <b>7</b>  |
| <b>Figura 5.</b>  | Regulación de la proliferación condrocítica   | <b>9</b>  |
| <b>Figura 6.</b>  | Terapia génica <i>ex vivo</i> en el tratamiento de lesiones articulares                           | <b>11</b> |
| <b>Figura 7.</b>  | Radiografías de rodilla de los modelos animales más empleados en el tratamiento de lesiones de CA | <b>13</b> |
| <b>Figura 8.</b>  | Esquema representativo de la estrategia experimental  | <b>20</b> |
| <b>Figura 9.</b>  | Producción del AdIGF-1  | <b>30</b> |
| <b>Figura 10.</b> | Producción de la matriz de cartílago bovino   | <b>31</b> |
| <b>Figura 11.</b> | Análisis de la MCB descelularizada  | <b>32</b> |
| <b>Figura 12.</b> | Aislamiento y cultivo de CMM de ovino   | <b>32</b> |
| <b>Figura 13.</b> | Generación y análisis de los implantes  | <b>33</b> |
| <b>Figura 14.</b> | Producción <i>in vitro</i> de IGF-1   | <b>34</b> |
| <b>Figura 15.</b> | Cirugías de implantación  | <b>36</b> |
| <b>Figura 16.</b> | Análisis macroscópico después de 20 semanas de tratamiento  | <b>38</b> |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>AGC</b>               | Agrecano   |
| <b>ATCC</b>              | <i>American Type Cell Culture</i>                |
| <b>CA</b>                | Cartílago articular                              |
| <b>CMM</b>               | Células madre mesenquimales                      |
| <b>COL I</b>             | Colágeno tipo I                                  |
| <b>COL II</b>            | Colágeno tipo II                                 |
| <b>COL X</b>             | Colágeno tipo X                                  |
| <b>CPE</b>               | Efecto citopático                                |
| <b>DMEM</b>              | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>          |
| <b>DMEM Adv</b>          | <i>Advanced Dulbecco's modified Eagle medium</i> |
| <b>g</b>                 | gramos   |
| <b>GAGs</b>              | Glicosaminoglicanos                              |
| <b>h</b>                 | horas  |
| <b>I2C</b>               | Implante de dos componentes                      |
| <b>I3C</b>               | Implante de tres componentes                     |
| <b>ICA</b>               | Implante de condrocitos autólogos                |
| <b>ICRS</b>              | International Cartilage Research Society         |
| <b>IGF-1</b>             | Factor de crecimiento similar a insulina-1       |
| <b>ISCT</b>              | International Society for Cell Therapy           |
| <b>MCB</b>               | Matriz de cartílago bovino                       |
| <b>MEC</b>               | Matriz extracelular                              |
| <b>min</b>               | minutos  |
| <b>mL</b>                | mililitros                                       |
| <b>MOI</b>               | Multiplicidad de infección                       |
| <b>PFU</b>               | Unidades formadoras de placas de lisis           |
| <b>PBS</b>               | Amortiguador salino de fosfatos                  |
| <b>PCR</b>               | Reacción en cadena de la polimerasa              |
| <b>PGCs</b>              | Proteoglicanos                                   |
| <b>PI3K</b>              | Fosfoinositol 3-quinasa                          |
| <b>rpm</b>               | Revoluciones por minuto                          |
| <b>SI</b>                | Sin implante                                     |
| <b>SFB</b>               | Suero fetal bovino                               |
| <b>TCID<sub>50</sub></b> | <i>Tissue culture infectious dose 50</i>         |
| <b>µm</b>                | Micrómetros                                      |

## RESUMEN

L.B.G. Nancy Rivera Bolaños


Fecha de Graduación: Enero de 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

**Título del Estudio:** Evaluación Preclínica *In Vivo* del Efecto Condrogénico de un Implante Construido a Partir de Células Madre Mesenquimales Modificadas Genéticamente y Cartilago Natural.**Área de Estudio:** Ingeniería Genética**Número de páginas:** 53

**INTRODUCCIÓN:** Entre las terapias actuales empleadas para el tratamiento de lesiones articulares la ingeniería de tejidos ofrece resultados prometedores. Nuestro grupo de investigación ha comprobado que la combinación *in vitro* de células madre mesenquimales autólogas, andamios naturales y el factor de crecimiento IGF-1 permite obtener implantes tridimensionales que promueven la condrogénesis. **OBJETIVO:** Evaluar macroscópicamente la regeneración de cartilago articular en rodilla en un modelo ovino después del tratamiento con un implante de tres componentes, construido a partir de células madre mesenquimales modificadas genéticamente con IGF-1 y embebidas en una matriz de cartilago natural/alginato. **MÉTODOS:** Un total de 21 borregos se separaron en 3 grupos experimentales, con 7 animales por grupo: lesión sin tratamiento (grupo 1), lesión tratada con implante de dos componentes (I2C - grupo 2) y lesión tratada con implante de 3 componentes (I3C - grupo 3). Las CMM utilizadas en los implantes se extrajeron del tejido adiposo de cada animal. Se realizaron perfiles de función hepática y biometrias hemáticas para los borregos que fueron tratados con los implantes. Al cabo de 5 meses de las cirugías de lesión e implantación se realizaron análisis macroscópicos de las lesiones en todos los animales. **RESULTADOS:** Al término del periodo de maduración *in vitro*, se observó un mayor incremento en el tamaño de los I3C en comparación con los I2C. Asimismo, la secreción de IGF-1 al medio de cultivo del grupo 3 fue mayor comparada con la del grupo 2 los días 7 y 14 post-transducción. No se observaron alteraciones en la función hepática de los animales relacionadas con el empleo del vector adenoviral. El área de las lesiones tratadas con I3C se reparó con una mayor cantidad de tejido similar al cartilago adyacente. **DISCUSIÓN:** Se comprobó mediante ELISA que las células empleadas en los I3C produjeron mayor cantidad de IGF-1 que las empleadas en los I2C. Es probable que el incremento significativo en el tamaño de los I3C, comparado con los I2C, se deba al aumento en producción de matriz extracelular; IGF-1 no sólo estimula la vía condrogénica, sino que también evita la degradación de la matriz producida. Las diferencias encontradas en el proceso de reparación tisular dentro de los grupos experimentales pueden deberse a la respuesta individual de cada animal al tratamiento. A pesar de que en los cóndilos tratados con I3C se observó mayor cantidad de tejido cartilaginoso cubriendo la zona de lesión, es recomendable analizar las características microscópicas de dicho tejido. **CONCLUSIÓN:** Después de 20 semanas de tratamiento las lesiones donde se colocaron los I3C se observaron, a nivel macroscópico, más reparadas que el resto de los grupos experimentales.



Dr. Augusto Rojas Martínez  
Director de Tesis

## CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Las alteraciones que afectan la anatomía y fisiología normales del cartílago articular se presentan con frecuencia en la rodilla. Además de la osteoartritis, los accidentes como consecuencia de actividades deportivas y recreativas son una de las principales causas del daño al tejido cartilaginoso y su prevalencia global va del 10 al 25%<sup>1</sup>. Este tipo de lesiones no sólo causan dolor al paciente y disminuyen su calidad de vida, sino que también conducen a la degeneración progresiva de las articulaciones debido a que el proceso de reparación natural del cartílago resulta limitado y poco eficiente. De forma natural es frecuente que el cartílago del área lesionada sea sustituido por tejido fibrocartilaginoso que rellena la lesión y favorece la degeneración articular<sup>2</sup>.

El tratamiento para las lesiones del cartílago articular en la rodilla sigue siendo un reto en el área ortopédica. Actualmente se cuenta con diversas opciones, desde medidas conservadoras como son la rehabilitación física e ingesta de medicamentos, hasta abordajes quirúrgicos para los casos más graves, como la condroplastía, microfractura, autoinjerto osteocondral y, desde hace más de 30 años, injerto autólogo de condrocitos<sup>3</sup>. Sin embargo se continúa en la búsqueda de alternativas terapéuticas que restauraren la integridad superficial y arquitectura natural del cartílago, permitiendo el movimiento sin dolor y prevengan el deterioro articular.

Como parte de dichas alternativas la combinación de técnicas de ingeniería de tejidos y terapia génica es una opción viable para lograr la regeneración articular. En las últimas décadas se han incrementado considerablemente el número de tratamientos que utilizan células madre adultas, ofreciendo la ventaja de que las células del mismo paciente que se pueden manipular y diferenciar hacia un linaje condrocítico.

Para lograr el desarrollo de una terapia que permita la regeneración del tejido lesionado es indispensable identificar los mecanismos involucrados en el mantenimiento natural del cartílago articular, con el fin de obtener un tejido cuyas características funcionales sean lo más similares posibles a las del cartílago articular nativo.<sup>4</sup>

## CAPÍTULO II ANTECEDENTES

### 2.1 Cartílago articular

La rodilla es la articulación central de los miembros inferiores del esqueleto humano; posee la capacidad de flexionarse, extenderse, rotar y deslizarse. Los componentes esqueléticos de la rodilla (fémur, rótula y tibia) se encuentran recubiertos por una estructura denominada cartílago<sup>5</sup>. El origen del tejido cartilaginoso en mamíferos es el mesénquima, derivado del mesoderma embrionario; este tejido es capaz de diferenciarse hacia distintas estirpes celulares como condroblastos, fibroblastos, y osteoblastos<sup>6</sup>. Los condroblastos son las células encargadas de la formación del cartílago mediante la producción y secreción de fibras de colágeno y de matriz extracelular (MEC). Dependiendo del tipo de MEC producida y el tipo de colágeno presente, es posible catalogar al tejido cartilaginoso en tres tipos: fibrocartílago, cartílago elástico y cartílago hialino, también conocido como cartílago articular<sup>7</sup>.



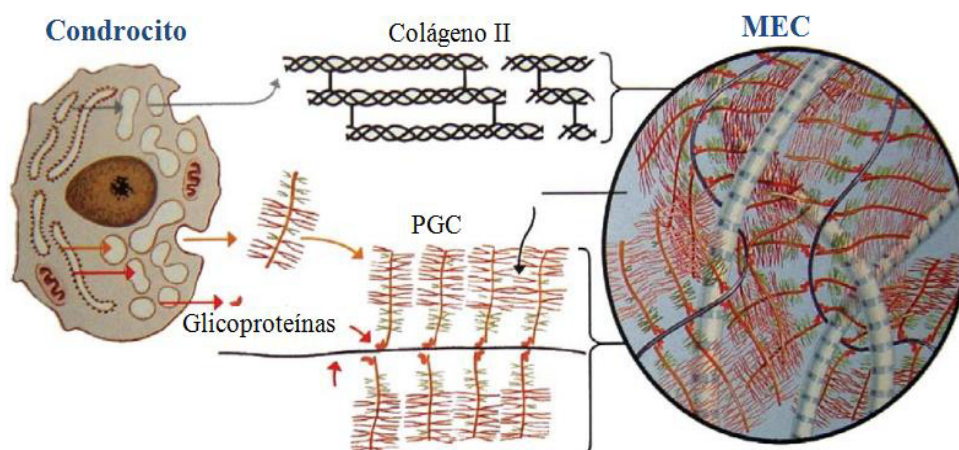
**Figura 1. Corte histológico del CA.** Tinción con hematoxilina-eosina en donde se aprecian los grupos de condrocitos embebidos en la MEC<sup>81</sup>.

El cartílago hialino o cartílago articular (CA) es un tejido avascular, aneural y alinfático presente la superficie externa de los huesos que conforman las articulaciones diartroidales. Entre sus principales funciones están dar soporte de carga mediante la distribución de la fuerza que reciben las estructuras óseas y proporcionar una superficie que permita el deslizamiento de la articulación con una mínima cantidad de fricción<sup>8</sup>. Se caracteriza por tener una composición heterogénea, cuyos elementos están diferencialmente distribuidos y organizados dependiendo de la zona donde se localicen. Al ser un tejido avascular, se nutre y elimina desechos gracias a la infiltración y difusión del líquido presente en la membrana sinovial por medio de fuerzas mecánicas de compresión en la articulación. Como se observa en la *Figura 1*, los componentes esenciales del CA son la MEC y en mucho menor proporción los condrocitos<sup>9</sup>.



### 2.1.1 Condrocitos

Los condrocitos son el único tipo celular presente en el CA, son altamente especializados y se encuentran agrupados en lagunas dentro de la MEC, por lo que no existe contacto entre ellos. A pesar de que su proporción respecto a la matriz no es mayor al 6%, poseen una actividad metabólica elevada y son los encargados del mantenimiento de la misma<sup>10</sup>. Si bien es cierto que las propiedades mecánicas del CA se deben principalmente a la MEC, la presencia de los condrocitos es indispensable para proporcionar las características anatómicas del CA nativo, puesto que llevan a cabo el recambio de los componentes de la matriz que son degradados de forma natural. Cuando los condrocitos se dividen comparten una misma laguna, sin embargo, conforme se incrementa la producción de MEC ocurre la separación de los mismos. Se sabe que la tasa de proliferación de los condrocitos es elevada en las etapas tempranas del desarrollo en los mamíferos, pues es necesario el crecimiento y remodelación del CA; sin embargo, una vez alcanzada la madurez del tejido, la proliferación celular sufre una disminución notable y como consecuencia la síntesis de MEC también se ve reducida. A pesar de dicho fenómeno, la síntesis de elementos para renovar la MEC, como colágeno y proteoglicanos (PGCs) principalmente, se sigue llevando a cabo. No obstante, las células no son capaces ni de conservar su capacidad de síntesis de elementos de la MEC, ni de responder a estímulos externos conforme transcurre la vida del individuo; de manera que el incremento en la edad restringe la capacidad de mantenimiento de la MEC y favorece el deterioro del CA<sup>11</sup>.



**Figura 2. Elementos de la MEC sintetizados por los condrocitos.** La producción de fibras de colágeno, PGCs y glicoproteínas dependen exclusivamente de metabolismo condrocítico<sup>12</sup>.

### 2.1.2 Matriz extracelular

La MEC corresponde a más del 90% de la composición total del CA y de ella dependen las propiedades biomecánicas del tejido; se compone principalmente de un conjunto de macromoléculas (colágeno tipo II, proteoglicanos, glicoproteínas) en combinación con un componente líquido<sup>12</sup>, como se esquematiza en la *Figura 2*.

#### 2.1.2.1 Componente líquido

El componente líquido de la MEC constituye más del 50% del peso húmedo del CA; además de agua están presentes gases, iones y diversos metabolitos cuya principal función es contrarrestar la carga negativa de los proteoglicanos. Debido a la gran cantidad de agua que hay en la MEC el CA puede sufrir cambios estructurales sin que el tejido se vea afectado; asimismo, el componente líquido facilita la lubricación y nutrición del tejido. Los cambios en el volumen normal producen alteraciones en las propiedades biomecánicas del cartílago. Por ejemplo, un menor volumen disminuye la capacidad elástica del CA, mientras que un volumen mayor incrementa la permeabilidad y por ende la difusión de los componentes de la MEC<sup>13</sup>.

#### 2.1.2.2 Colágeno

La presencia de colágenos en el CA contribuye con alrededor del 20% de su peso seco; las fibras de colágeno interactúan con los PGCs y confieren al tejido forma y resistencia a la tensión. Si bien el colágeno tipo II es el que se encuentra presente en mayor proporción, con cerca del 95%, también es posible encontrar colágenos del tipo I, V, VI, IX, X y XI que en baja proporción son responsables de la estabilización de las fibras de colágeno II. Si existen cantidades elevadas de colágeno X es probable que esté ocurriendo mineralización del CA, ya que este tipo de colágeno es característico de tejido calcificado<sup>14</sup>.

#### 2.1.2.3 Proteoglicanos

Los proteoglicanos contribuyen con aproximadamente el 15% del peso seco de la MEC, son macromoléculas que se encuentran unidas al colágeno e interactúan con el agua, permitiendo la formación de poros que ayudan a que en caso de compresión del CA no ocurra rompimiento del tejido. La estructura de los PGCs tiene un centro de naturaleza proteica al cual se unen subunidades de moléculas denominadas glicosaminoglicanos (GAGs). La naturaleza de los GAGs varía en función de la organización interna del tejido, la presencia de alguna patología o la



edad del individuo. Entre los GAGs presentes en el CA se encuentran el ácido hialurónico, condroitín, dermatán y queratán sulfato, pero únicamente los tres últimos son componentes de los PGCs.

El PGC más abundante en el CA es el agregano (90%), formado por cadenas de queratán sulfato y condroitín sulfato. En menor proporción se encuentran el biglicano, la fibromodulina y la decorina. Cuando ocurre pérdida de PGCs en el CA se observa menor capacidad de movilidad y pérdida de la estructura nativa del tejido<sup>15</sup>.

#### 2.1.2.4 Glicoproteínas

Las glicoproteínas como ancorina C-II, fibronectina, laminina e integrina forman parte del resto de los componentes moleculares del CA. Es probable que participen en el mantenimiento y estructuración de la red de colágeno, así como en la interacción entre los condrocitos y la MEC. La fibronectina está relacionada con la interacción entre condrocitos y matriz; se sospecha que juega un papel importante en la osteoartritis<sup>16</sup>. Asimismo, se ha reportado que la ancorina C-II participa en la unión de las células a las fibras de colágeno II<sup>17</sup>. Las integrinas participan en procesos de regulación del metabolismo celular y facilitan el encendido y apagado de diversas vías de señalización condrocíticas<sup>18</sup>.

#### 2.1.3 Organización tisular

En la arquitectura del CA es posible identificar una organización específica de condrocitos, colágenos, PGCs y glicoproteínas. La distinta composición y distribución de las biomoléculas a lo largo del tejido, desde la superficie articular hasta llegar a hueso subcondral, permite establecer la existencia de cuatro zonas con características morfológicas distintas. (Figura 3) Si bien todas las muestras de CA presentan estas cuatro zonas, existen diferencias en su tamaño dependiendo de la localización del tejido y de su origen<sup>15,19,20,21</sup>.



**Figura 3. Zonas del CA.** Tinción con safranina O-verde rápido; se distinguen las 4 diferentes zonas características de la arquitectura del CA<sup>81</sup>.

**Zona superficial:** Es una zona con abundantes fibras de colágeno tipo II que permiten es desplazamiento sin fricción del hueso. Los condrocitos presentes son metabólicamente bajos en actividad y la MEC que producen tiene pocos PGCs. Ofrece mayor resistencia a la compresión que el cartílago de zonas más profundas.

**Zona transicional:** Posee características morfológicas entre la zona superficial y radial; se observa mayor cantidad de PGCs pero no tiene la misma abundancia de colágeno II que la zona superficial.

**Zona radial:** Las fibras de colágeno encontradas en esta zona tienen mayor diámetro, hay una concentración elevada de PGCs, poca presencia del componente líquido y se observan las células alineadas en columnas.

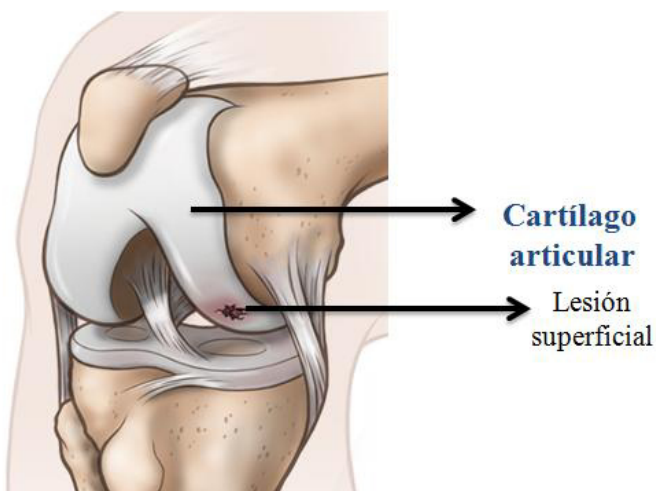
**Zona calcificada:** Las células presentes no son abundantes, tienen una tasa metabólica baja y producen una matriz pobre en PGCs. Se caracteriza por la presencia de hidroxapatita.

## **2.2 Alteraciones en el tejido cartilaginoso**

En el caso de los seres humanos, el CA tiene la capacidad de funcionar normalmente y sufrir de deterioro no incapacitante durante 50-60 años aproximadamente. Sin embargo, si ocurren cambios en la estructura o composición de los condrocitos o MEC las propiedades anatómicas del tejido se verán afectadas; lo anterior tiene como consecuencia alteraciones en el funcionamiento normal del tejido. A diferencia de otros tejidos, donde ocurre regeneración en caso de que se presente una lesión, el CA tiene una capacidad de regeneración bastante limitada, la cual ha sido asociada a tres posibles causas<sup>22,23</sup>.

**Anatomía tisular:** El CA es un tejido que se encuentra aislado dentro de la membrana sinovial; al ser avascular, aneural y alinfático no le es posible montar una respuesta inflamatoria, necesaria para iniciar un proceso reparativo.

**Condrocitos:** La regeneración y mantenimiento de la MEC, que es quien confiere las propiedades anatómicas y fisiológicas de importancia al CA, dependen exclusivamente de los condrocitos. Sin embargo, estas células están presentes en una proporción muy baja en el tejido adulto, además de que proliferan con abundancia únicamente en las etapas tempranas del desarrollo.



**Figura 4. Lesión superficial del cartílago.** Ejemplo de una lesión que afecta únicamente la superficie de cartílago, sin llegar a la zona del hueso subcondral<sup>24</sup>.

MEC: La naturaleza eléctrica de las biomoléculas presentes en la matriz cartilaginosa hace difícil el tránsito de moléculas o enzimas que pudieran participar en la regeneración del tejido.

Debido a las características asintomáticas de las lesiones articulares es común que para el momento en el que el paciente refiere una molestia el daño al cartílago es severo. Entre las principales lesiones se encuentran el

daño a la zona superficial del tejido, la reducción del espesor del tejido sin afectar la zona subcondral y alteraciones que penetran hueso subcondral<sup>24</sup>. (Figura 4) Algunas de las causas de que ocurra una lesión articular son: ocurrencia de traumatismos por deporte, desgaste por exceso de carga debido a la obesidad, desgaste natural por la edad y enfermedad articular, también conocida como osteoartrosis.

La osteoartrosis se presenta comúnmente en personas de edad avanzada; se caracteriza por la presencia de inflamación, dolor y disminución funcional de la articulación<sup>25</sup>. En países desarrollados y en desarrollo es una de las principales causas de incapacidad en las personas de la tercera edad. Además, es posible que lesiones del cartílago originadas durante la actividad física cotidiana puedan progresar hacia osteoartrosis en personas jóvenes, por efecto de sobrecarga<sup>26</sup>.

### 2.2.1 Tratamiento de lesiones en el CA

La elección del tratamiento en la reparación del CA depende de la gravedad de la lesión, la actividad cotidiana a la que se somete el paciente, su peso y edad. Un tratamiento ideal busca no sólo eliminar el dolor y permitirle al paciente recuperar la movilidad de la extremidad, sino que además se pretende regenerar el área lesionada con un tejido que tenga las características anatómicas y fisiológicas similares al CA nativo<sup>25</sup>.

Si el hallazgo se realiza en un estadio temprano, es posible administrar un tratamiento que incluya rehabilitación e ingesta de medicamentos para el control del dolor; sin embargo, en la mayoría de los casos no ocurre así. Debido a que es necesaria la presencia de un componente

celular para que ocurra la regeneración del CA existen diversos abordajes terapéuticos denominados técnicas artroscópicas que, mediante incisiones de pequeño tamaño introducen instrumental de microcirugía y realizan microfracturas, abrasión y desbridamiento. Las microfracturas consisten realizar perforaciones hasta hueso subcondral para favorecer la irrigación de la lesión y migración de biomoléculas que induzcan la regeneración.

Asimismo, ya se realizan mosaicoplastías, trasplantes de aloinjerto e injertos de condrocitos autólogos (ICA). Este último tratamiento implica tomar una muestra de CA del paciente en una zona sin carga, cultivar los condrocitos e inyectarlos una vez expandidos en la zona dañada; sin embargo, la disponibilidad de material biológico se ve limitada<sup>27</sup>.

### 2.2.2 Ingeniería de tejidos

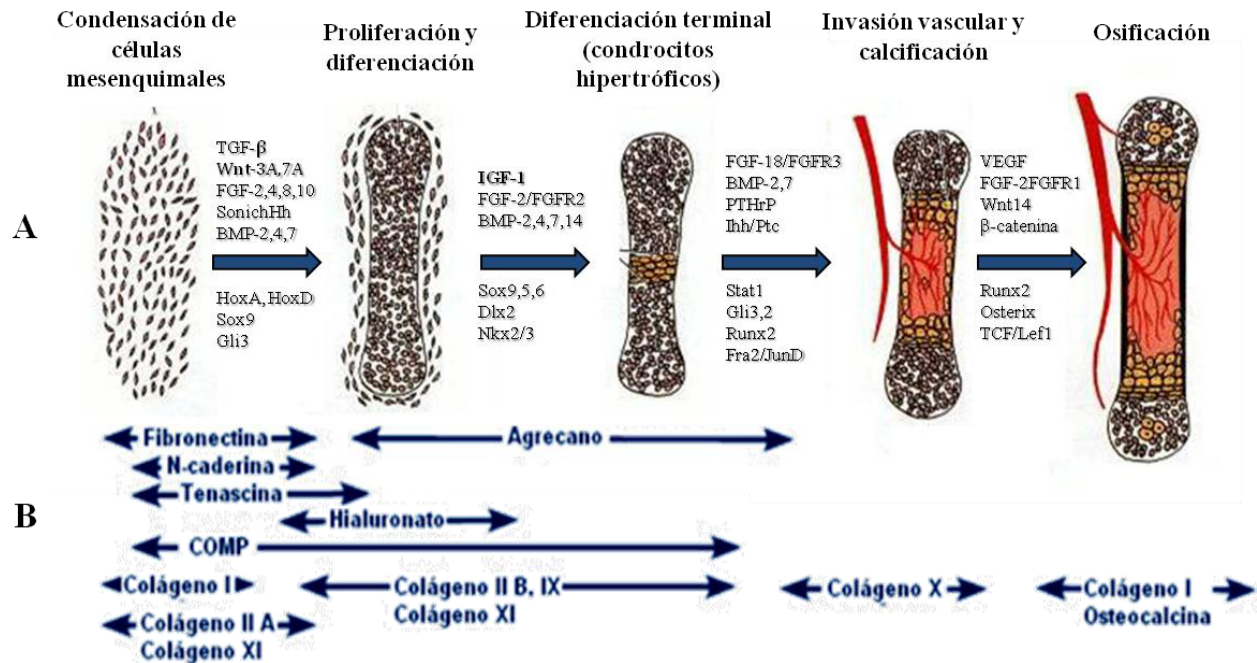
En la búsqueda de opciones terapéuticas para lesiones de CA se han empleado diversos enfoques con la intención de sustituir el tejido dañado por uno funcional. La ingeniería de tejidos es una rama de la ciencia que tiene como finalidad el desarrollo de biomateriales; busca encontrar la combinación adecuada de tres elementos que permitan crear tejidos biológicos funcionales en un sistema vivo: células, moléculas biológicamente activas y andamios<sup>28</sup>.

#### 2.2.2.1 Componentes celulares

Idealmente se buscan componentes celulares cuya obtención sea fácil, rápida y que no cause problemas éticos. Entre las células más utilizadas en ingeniería tisular de CA se encuentran los condrocitos y las células madre, ya que se ha demostrado que ambas cuentan con el potencial de producir los componentes de la MEC<sup>29</sup>.

##### 2.2.2.1.1 Condrocitos

La primera opción celular para la regeneración de CA fueron los condrocitos, ya que al ser las células nativas del tejido son capaces de producir los componentes de la MEC. Para la obtención de un número adecuado de condrocitos es necesario realizar su expansión *in vitro*, sin embargo, se ha reportado que en cultivos en monocapa ocurre un proceso de des-diferenciación y las células secretan una MEC con características fibrosas<sup>30,31</sup>. Sin embargo, el cultivo tridimensional de condrocitos evita la pérdida del fenotipo celular<sup>32</sup>.



**Figura 5. Regulación de la diferenciación esquelética.** A) Existen diferentes factores involucrados en la diferenciación y mantenimiento del tejido cartilaginoso y óseo; en la parte superior de las flechas se enlistan los factores de crecimiento y en la parte inferior los de transcripción. B) Proteínas características de las matrices en las diversas etapas de diferenciación<sup>82</sup>.

#### 2.2.2.1.2 Células madre mesenquimales (CMM)

Son células no especializadas cuya capacidad de renovación, proliferación y diferenciación permite su empleo en diversos tipos de terapias celulares. Se localizan en múltiples órganos y su capacidad multipotente les permite diferenciarse hacia linaje muscular, óseo, adiposo y cartilaginoso<sup>33</sup>. Se identifican, de acuerdo a la ISCT, como poblaciones celulares positivas para los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 y negativas para CD45 y CD3438. Tienen la ventaja de que su obtención se realiza mediante métodos mínimamente invasivos, su tiempo de duplicación es de 60 h aproximadamente y se llegan a tener porcentajes de recuperación de hasta 2.5%<sup>35,39</sup>.

Desde hace más de 10 años se reportó que las CMM derivadas de tejido adiposo son capaces de diferenciarse a cartílago y producir algunos de los componentes de la MEC como colágeno tipo II y PGCs<sup>34,36,37</sup>.

### 2.2.2.2 Biomoléculas

Las moléculas con actividad biológica son aquellos factores capaces de inducir y mantener el linaje celular de interés conforme las células proliferan. Como se observa en la *Figura 5*, el proceso condrogénico y la síntesis de MEC son dos eventos regulados por una multitud de factores. Se ha reportado el empleo de diversos factores de crecimiento y de transcripción para la diferenciación y proliferación *in vitro* de tejido similar al CA; algunos ejemplos se mencionan a continuación en la *Tabla 1*:

|              |   |
|--------------|---|
| <b>BMPs</b>  | Tanto BMP-2 como BMP-4 inducen el proceso de diferenciación de CMM a condrocitos <sup>40</sup> . Cuando cultivos de condrocitos fueron tratados con BMP-2 se observó un incremento en la producción de agregano y colágeno II <sup>41</sup> . BMP-7 es crítico para la producción de PGCs y la homeostasis del líquido sinovial <sup>41</sup> .                           |
| <b>FGF</b>   | FGF-2 empleado en un cultivo de condrocitos favoreció la síntesis de MEC y ayudó al mantenimiento de la misma <sup>45</sup> . Además promovió la diferenciación de CMM hacia condrocitos e inhibió la diferenciación hacia osteoblastos <sup>46,47</sup> .  |
| <b>IGF-1</b> | Tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> se ha reportado que es un factor clave en la producción, mantenimiento y crecimiento de la MEC <sup>48</sup> ; además es capaz de inducir la diferenciación de CMM a condrocitos <sup>49</sup> .  |
| <b>Sox9</b>  | Está presente en las etapas tempranas de la condrogénesis, favoreciendo la proliferación de condrocitos y la producción de MEC <sup>50</sup> . En un modelo <i>in vivo</i> su administración disminuyó la progresión de condrocitos hacia células hipertróficas <sup>51</sup> .   |
| <b>TGF-β</b> | Promueven la diferenciación de CMM hacia un linaje pre-condrogénico e incrementa la expresión de genes como colágeno tipo II y PGC <sup>42</sup> , además de inhibir el proceso de osificación <sup>43</sup> . Sin embargo, también se ha reportado que el bloqueo de TGF-β después de una lesión condral en roedores previene una formación ósea anormal <sup>44</sup> . |

**Tabla 1.** Uso de algunos factores de crecimiento y de transcripción en el tratamiento de lesiones articulares.

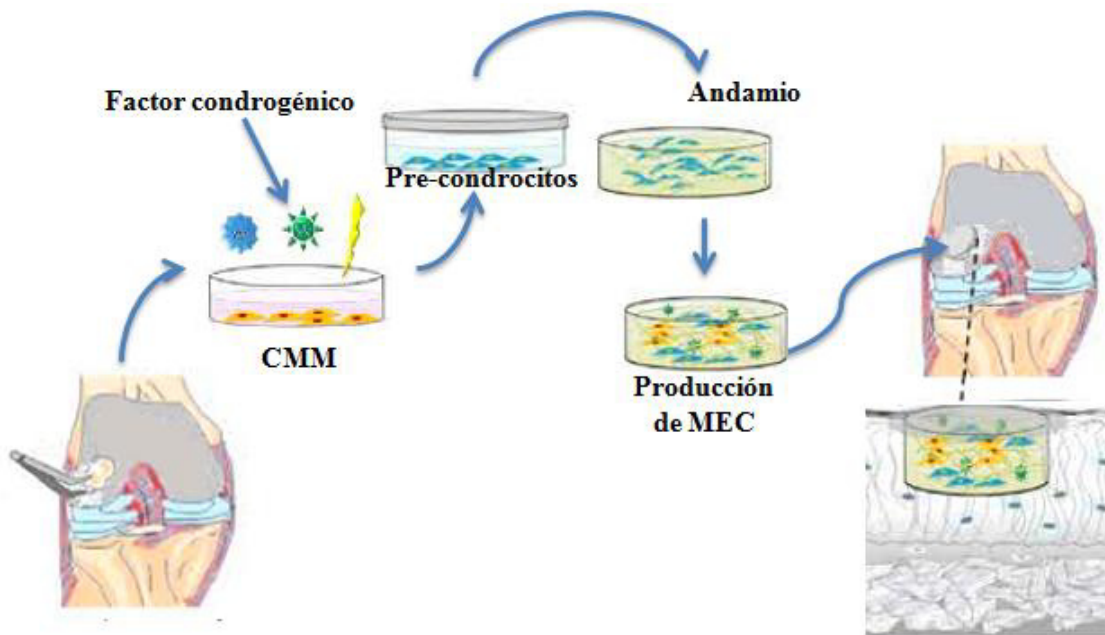
Es importante destacar que el empleo de estos factores, ya sea solos o en combinación, no sólo ha demostrado buenos resultados *in vitro*, sino que ya se considera una alternativa viable en el tratamiento de lesiones focales de modelos animales<sup>52</sup>.



#### 2.2.2.2.1 Terapia génica

La terapia génica consiste en la modificación de un tejido mediante la introducción de material genético, con la intención de producir un efecto biológico que permita tratar una patología. El empleo de la terapia génica en el tratamiento de lesiones del CA es un enfoque que se ha empleado por casi 20 años<sup>53</sup>. Ofrece la posibilidad de modificar genéticamente las células con los factores de interés, permitiendo incrementar la vida media de dichos factores en la zona de reparación puesto que la expresión de los mismos es más prolongada<sup>54,55</sup>.

Entre las opciones que existen para realizar dicha modificación se encuentran el uso de vectores no virales (liposomas, ADN desnudo, pistola génica) y de vectores virales (adenovirus, lentivirus, virus adeno-asociados). Si los vectores se administran directamente en la zona lesionada la estrategia se conoce como terapia génica *in vivo*; sin embargo, cuando se trabaja en conjunto con la ingeniería tisular y las células se manipulan *in vitro* antes de ser colocadas en el área de interés se habla de terapia génica *ex vivo*<sup>56,57</sup>. (Figura 6)



**Figura 6. Terapia génica *ex vivo* en el tratamiento de lesiones articulares.** Se obtienen CMM autólogas y se diferencian con un factor condrogénico; cuando presentan características del linaje condrocítico se combinan con el andamio biocompatible para obtener el implante. Después de un periodo de maduración *in vitro* es posible observar la producción de MEC y en ese punto coloca el implante en la lesión condral<sup>48</sup>.

En el tratamiento de lesiones de CA se han empleado ambos enfoques con resultados prometedores. La administración de IGF-1 mediante un vector adeno-asociado (rAAV) en una lesión de rodilla en conejos estimuló la producción de MEC y favoreció la regeneración del CA en la lesión<sup>58</sup>. También se ha reportado que lesiones en conejos tratadas *in vivo* con rAAVSox9 fueron capaces de producir cartílago no hipertrófico y reparación del hueso subcondral<sup>51</sup>.

En 2014 se reportó que el empleo de un implante de condrocitos autólogos modificados con IGF-1 y cultivados *in vitro* en una lesión condral en equinos produjo mejores resultados al cabo de 8 meses de tratamiento<sup>59</sup>. Un año antes otro grupo de investigación reportó hallazgos similares en un grupo de conejos con una lesión en CA tratada con condrocitos e IGF-I por un periodo de 7 meses<sup>60</sup>.

### 2.2.2.3 Sistema de andamiaje

El microambiente en el que se cultivan las células influye en la proliferación y mantenimiento del linaje condrocítico. Los soportes formados por matrices porosas proporcionan a las células un espacio tridimensional para adherirse, diferenciarse proliferar, migrar y producir MEC<sup>61</sup>. Debido a que los andamios tienen la función de soporte celular, es necesario que se empleen materiales biocompatibles y biodegradables en su elaboración. No sólo los componentes de los andamios influyen en el comportamiento celular, sino también su arquitectura<sup>62</sup>. El microambiente debe ser adecuado tanto para la adhesión y migración celular, como para la retención de la MEC producida<sup>63</sup>.

Para el tratamiento de lesiones articulares se ha reportado la elaboración de soportes compuestos naturales como fibrina, alginato, colágeno y quitosán, así como polímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico; sin embargo, no todos ellos presentan las características mecánicas para resistir las fuerzas de compresión a las que se somete el CA<sup>64</sup>. El empleo de andamios con más de un componente permite incrementar la dureza de los andamios y crear un efecto sinérgico<sup>65</sup>.

El alginato es un polímero biocompatible derivado de algas que permite la elaboración de matrices gelificadas, donde se ha reportado que las CMM son capaces de diferenciarse y producir MEC<sup>66</sup>. Un inconveniente de este material es la ausencia de bioreceptores que interactúen con el componente celular, sin embargo, es posible combinarlo con tejido descelularizado para obtener una matriz biosintética<sup>67</sup>.



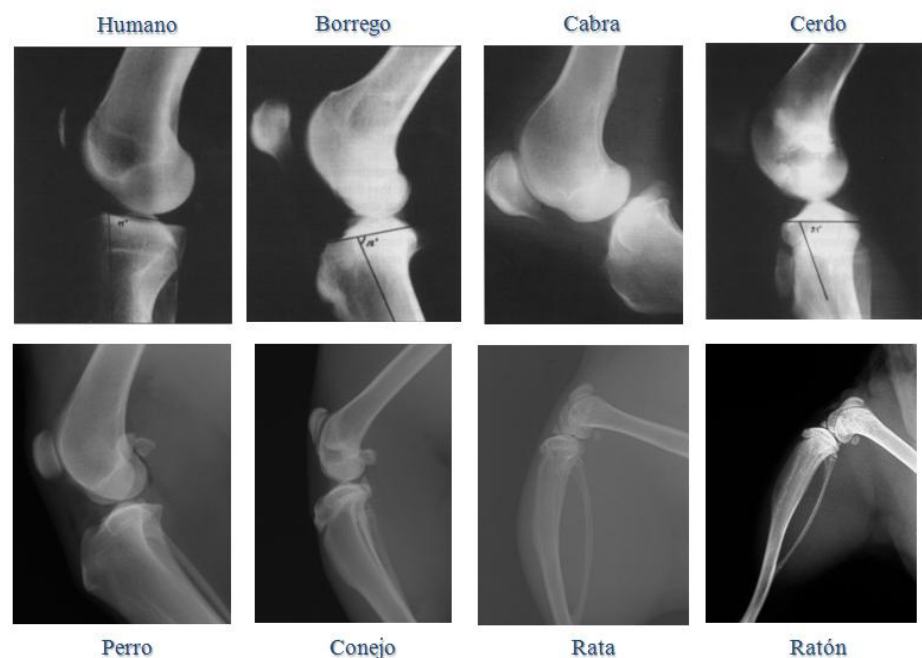
### 2.3 Modelos Animales

El empleo de células condrocíticas expandidas *in vitro*, tanto en monocapa como en cultivos tridimensionales, ha permitido la obtención de un tejido con características morfológicas similares a las del CA. Sin embargo, para que el tejido que se produce mediante ingeniería tisular sea considerado como cartílago es necesario probarlo en un ambiente donde esté sometido a la compresión mecánica que el tejido nativo soporta<sup>68</sup>.

Asimismo, se ha documentado que las fuerzas mecánicas tienen una influencia positiva en la generación de MEC en cultivos *in vitro* de condrocitos y CMM diferenciadas<sup>69,70,71</sup>. Se observó el incremento de marcadores condrogénicos como colágeno tipo II y agrecano en CMM encapsuladas en hidrogel y sometidas a presión diaria, en comparación con el grupo experimental que no fue sometido a compresión en el biorreactor<sup>72</sup>. Asimismo CMM cultivadas en andamios de agarosa que recibieron compresión dinámica 12 h diarias sintetizaron una cantidad de PGCs significativamente mayor que los cultivos que no se sometieron a estrés mecánico<sup>73</sup>.

Es por ello que el uso previo de modelos animales se ha vuelto esencial para la aprobación de nuevas estrategias terapéuticas en seres humanos. Si bien es cierto que no existe un modelo animal idóneo, en el área de regeneración del CA se emplean varias especies, como ratas, conejos, perros, cerdos, caballos, cabras y borregos<sup>74</sup>.

**Figura 7. Radiografías de rodilla de los modelos animales más empleados en el tratamiento de lesiones de CA. Se prefiere el uso de animales de mayor tamaño debido a la similitud anatómica ósea con el ser humano.<sup>80</sup>**



En la elección del modelo animal deben considerarse aspectos como el costo de adquisición y mantenimiento de los animales, la facilidad de manipulación, permisos éticos y principalmente que el potencial de regeneración articular sea comparable con el del ser humano<sup>75,76</sup>.

Algunas de las ventajas del utilizar el modelo ovino (*Ovis aries*) son: el tamaño de sus articulaciones (*Figura 7*) y el grosor del cartílago (0.4-1.5 mm), los cuales permiten recrear lesiones articulares similares a las que ocurren en humanos<sup>77</sup>. Se utiliza principalmente en lesiones de rodilla<sup>78</sup> y es posible crear lesiones que no requieran de cuidados post-operatorios prolongados<sup>79</sup>, de modo que los costos de su cuidado no se incrementen después de la cirugía.

## 2.4 Antecedentes directos

El grupo de trabajo, encabezado por el Dr. Augusto Rojas Martínez y la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, ha establecido una línea de investigación enfocada al desarrollo de terapias celulares y moleculares para el tratamiento de lesiones en cartílago articular. Los procedimientos experimentales se han realizado en los laboratorios de Terapia Génica y Terapia Celular del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en el Banco de Hueso y Tejidos del HU, así como en la unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. A continuación se describen los hallazgos de los 7 antecedentes directos que sentaron las bases para el desarrollo experimental de este trabajo:

2006; Lara-Arias J. “Cultivo de condrocitos autólogos humanos para la implantación en lesiones articulares” Un paciente de 23 años con lesión osteocondral fue tratado con un implante elaborado a partir de sus propios condrocitos y una matriz de fibrina. Transcurridos 6 meses desde la cirugía el paciente presentó una recuperación clínica y reincorporación a sus actividades cotidianas. Sin embargo, una biopsia de la zona regenerada permitió identificar que el tejido que regeneró la lesión fue predominantemente colágeno tipo I.

2010; Lara-Arias J. “Efecto de la expresión transitoria de hIGF-1 y hFGF-2 en condrocitos humanos incluidos en una matriz de fibrina y cultivados en un sistema dinámico” Se estimularon cultivos de condrocitos humanos con los factores de crecimiento hIGF1 y hFGF2, para posteriormente embeberlos en soportes de fibrina y cultivarlos en medio DMEM con flujo dinámico. Se observó que la combinación de ambos factores favoreció la producción de GAGs y aumentó significativamente la expresión de colágeno II en el implante.

2012; Garza-Veloz I. “Desarrollo de un implante de CMM modificadas genéticamente para remplazo de cartílago” Para identificar los factores que optimizan la condrogénesis de CMM adultas se transdujeron CMM ovinas, derivadas de tejido adiposo, con vectores adenovirales. Se observó que la co-expresión de IGF-1 y FGF-2 tuvo un mayor efecto en la inducción de condrogénesis de las CMM en monocapa en comparación con el resto de las combinaciones de factores evaluadas. Asimismo, se creó un implante con las CMM diferenciadas y alginato, en el cuál se observó la capacidad de las células de proliferar y la producción de colágeno II y X.

2012; Espinoza-Juárez M. “Análisis de un implante para cartílago de células madre mesenquimales modificadas genéticamente con factores condrogénicos en *Ovis aries*” Lesiones condrales de un grupo de borregos se trataron con un implante a base de fibrina comercial (Tissucol) y CMM autólogas obtenidas de tejido adiposo y modificadas genéticamente con los factores IGF-1 y FGF-2. Al cabo de 4 meses no se observó una reparación óptima, ya que los análisis del área regenerada mostraron la presencia de tejido fibroso.

2012; González-Rodríguez M. “Análisis de expresión génica del proceso condrogénico en células madres mesenquimales transducidas con vectores adenovirales con los factores IGF1 y FGF2” Se cultivaron CMM humanas transducidas con los vectores IGF-1 y FGF-2 y con dichas células se crearon implantes empleando la matriz de fibrina Tissucol. Después de mantener los implantes 28 días en cultivo *in vitro* se concluyó que el andamio de fibrina no fue adecuado para inducir una diferenciación condrogénica, sino que favorece un perfil de expresión hacia condrocitos hipertróficos.

2014; Moncada-Saucedo N. “Desarrollo de un implante cultivado de CMM transducidas con IGF-1 en una matriz de cartílago natural” Se generó un sistema de andamiaje de tres componentes (matriz de cartílago bovino con alginato, CMM y Ad-IGF1) el cual permitió la infiltración, adhesión, proliferación y diferenciación de las células. En el implante generado (I3C) se observó la presencia de MEC densa, PGC y colágeno II, característicos del cartílago articular.

2014; Galván-de los Santos A. “Análisis de un Implante para Cartílago de Células Madre Mesenquimales Modificadas Genéticamente con Factores Condrogénicos en *Ovis aries*” En un estudio piloto, a 4 borregas se les realizó una lesión en el cóndilo medial, la cual fue tratada con I2C e I3C. Después de 12 semanas se observó que las lesiones tratadas con el I3C tuvieron mejor reestructuración tisular y mayor puntuación en la escala de evaluación histológica de O’Driscoll.

### **CAPÍTULO III JUSTIFICACIÓN**

Resultados de los estudios *in vitro* realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que las CMMs transducidas con el factor condrogénico IGF-1 y embebidas en una matriz de cartílago natural y alginato favorecen la formación de colágeno II y proteoglicanos, característicos de la matriz cartilaginosa. Asimismo, un estudio piloto *in vivo* determinó que después de un periodo de 12 semanas la lesión tratada con esta combinación de elementos se observa significativamente más regenerada que los demás grupos experimentales.

Es por ello que en este trabajo se pretende realizar un ensayo pre-clínico para evaluar la eficacia en la regeneración de cartílago, utilizando un implante con los elementos previamente mencionados, en una lesión articular de cóndilo en un modelo ovino. Los resultados obtenidos permitirían sentar las bases para futuros estudios clínicos enfocados al tratamiento de lesiones cartilaginosas.

## **CAPÍTULO IV**

### **HIPÓTESIS**

El implante de CMM transducidas con el gen IGF-1 y embebidas en matriz de cartílago natural/alginato colocado sobre una lesión condral inducirá una regeneración articular con características histológicas y anatómicas más similares a las del cartílago sano, que las lesiones tratadas con el implante de CMM no modificadas genéticamente y que las lesiones sin implante.

## **CAPÍTULO V**

### **OBJETIVO GENERAL**

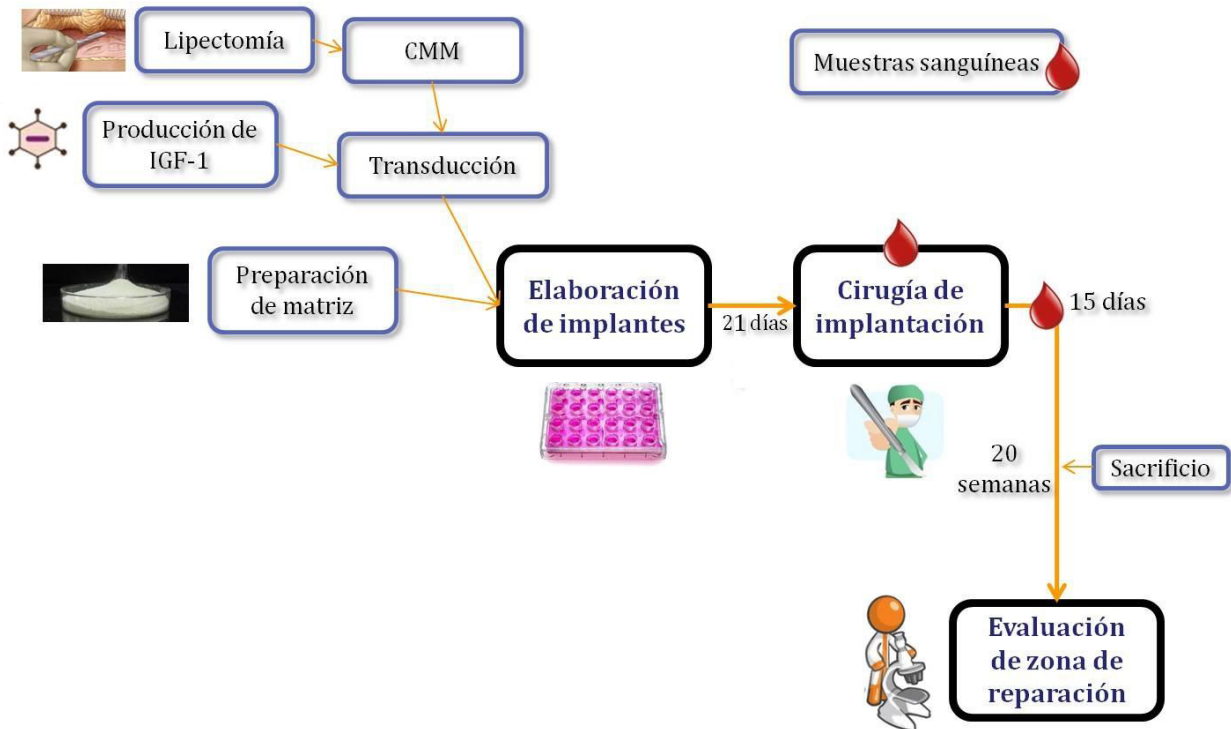
Evaluar macroscópicamente la regeneración de cartílago articular en rodilla en un modelo ovino después del tratamiento con un implante construido a partir de CMM modificadas genéticamente con IGF-1 y embebidas en una matriz de cartílago natural/alginato.

## **CAPÍTULO VI**

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar la expresión de IGF-1 entre las CMM empleadas en la elaboración de I2C e I3C.
2. Determinar la existencia de efectos adversos en el modelo animal debidos al empleo del implante.
3. Evaluar macroscópicamente qué grupo experimental tiene mayor reparación tisular en el área de la lesión.

## CAPÍTULO VII ESTRATEGIA GENERAL



**Figura 8. Esquema representativo de la estrategia experimental.** Los procedimientos se describen a continuación.

**Lipectomía:** extracción de tejido adiposo de la región preesternal de las 21 hembras evaluadas (*Ovis aries*, raza pelibuey).

**Producción de IGF-1:** se realizó la producción, purificación y titulación del vector adenoviral empleado en la modificación genética de las CMM.

**Preparación de la matriz:** la muestra de cartílago hialino bovino fue descelularizada, molida y esterilizada.

**Extracción y cultivo de CMM:** el tejido adiposo fue procesado con métodos enzimáticos hasta obtener una separación en dos fases; las CMM obtenidas a partir del infranadante se cultivaron en medio basal.

**Elaboración de implantes:** las CMM se cultivaron en medio condrogénico durante 7 días, siendo transducidas únicamente las del grupo 3; el implante se elaboró mezclando CMM, MCB y alginato y fue gelificado con  $\text{CaCl}_2$ .

**Cirugía de implantación:** 21 días posteriores a su elaboración los implantes se colocaron en lesiones de 6mm de diámetro realizadas en el cóndilo medial de las borregas.

**Muestras sanguíneas:** se tomaron previa la cirugía de implantación y 15 días posteriores a la misma; se emplearon para realizar perfil de función hepática y biometría hemática de los animales que recibieron los implantes.

**20 semanas de observación:** se mantuvo a los animales en estabulación y pastoreo normales; posterior al sacrificio se obtuvo la zona de lesión.

**Evaluación de la zona de reparación:** se evaluó macroscópicamente la reparación de la lesión.



## CAPÍTULO VIII MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Material Biológico

Producción viral. Células HEK-293 (riñón embrionario humano, ATCC CRL-1579<sup>TM</sup> (Manassas, VA) almacenadas a -80°C en el laboratorio. El vector adenoviral AdIGF-1 empleado en la producción fue proporcionado por el M.C. Manuel González y la M.C. Marcela Espinoza Juárez, quienes lo produjeron como parte de su tesis de maestría a partir del vector construido por la Dra. C. Idalia Garza Veloz como parte de su tesis doctoral.

Borregos. 21 hembras jóvenes (4-6 meses) de la raza pelibuey, genéticamente heterogéneas e inmunocompetentes, con peso inicial de 17-20 kg, se dividieron en tres grupos experimentales (n=7). El uso de los animales se aprobó por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina UANL (BI12-002).

Matriz de cartílago bovino (MCB). Cartílago bovino obtenido del área de cóndilos, rótula, tróclea femoral y cabeza femoral provenientes de 7 rodillas.

Implantes. CMM autólogas aisladas de tejido adiposo obtenido mediante lipectomía en la zona preesternal de cada animal. Para el andamio se empleó el cartílago articular bovino descelularizado, molido e irradiado bajo los parámetros del Banco de Hueso y Tejidos de la UANL.

Pruebas de toxicidad. Muestras de sangre y suero a partir de la yugular de cada animal, obtenidas previa colocación del implante y 15 días posteriores al procedimiento.

### 8.2 Materiales y Reactivos

Cultivo celular. Las células empleadas en la producción adenoviral y las CMM en expansión se cultivaron con medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's; num. cat. 15-013-CVR, Corning. Mediatech, Inc. EE.UU.), mientras que las CMM empleadas en los implantes fueron cultivadas con medio condrogénico DMEM Advance (Advance Dulbecco's Modified Eagle; num. cat. 12491-015, Invitrogen. Carlsbad, CA). Los reactivos empleados para suplementar los medios de cultivo fueron suero fetal bovino (HyClone; num. cat. SH30071.03IR, GE Healthcare,

Logan, Utah), tripsina al 0.25% (num. cat. 15090-046, Invitrogen. Carlsbad, CA), antibiótico-antimicótico 100X (GIBCO-BRL. Grand Island, NY), L-glutamina 200mM 100X (GIBCO); asimismo, al medio condrogénico se le adicionaron albúmina bovina (num. cat. A1312, United States Biological. MA, EE.UU.), ácido linoléico (num. cat. 013-19641, Wako. Japón), ácido L-ascórbico (num. cat. 013-19641, Wako. Japón) y L-prolina (num. cat. PB0923, BIO BASIC CANADA INC. Ontario, Canadá). También se emplearon placas de cultivo con fondo plano de 6 pozos (Corning), botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> y 150 cm<sup>2</sup> (Corning. Costar City, NY), tubos de plástico de 15 mL y 50 mL (Corning), tubos para microcentrífuga de 2 mL, criotubos de 1 mL (Corning), pipetas serológicas desechables de 5 mL, 10 mL y 25 mL (Corning) y scrapers (Corning). Para aislar las CMM del tejido adiposo fueron utilizados Colagenasa I (GIBCO), PBS (Amresco, Solon OH), cajas Petri de 100 mm (CELLTREAT. SHIRLEY, MA) y hojas para bisturí (Konus).

**Purificación y titulación viral.** En la purificación adenoviral se empleó cloruro de cesio (GIBCOBRL, Grand Island NY), glicerina (Research Organics. Cleveland, OH), Tris (Amresco), cloruro de sodio (Invitrogen), cloruro de magnesio (Invitrogen), tubos de polialómero (Beckman, Palo Alto CA), membranas de diálisis Slide-A-Lyzer 10K (Pierce. Rockford, IL) y PBS (Amresco, Solon OH). Para la titulación se utilizaron placas de cultivo con fondo plano de 96 pozos (Corning),

**Procesamiento y análisis de la matriz de cartílago bovino.** Se emplearon hojas de bisturí #11 (Swann-Morton ®, UK) nitrógeno líquido (Praxair), SDS (Bio-Rad. CA), Tritón 100X (Invitrogen), tubos de plástico de 50 mL (Corning) y PBS 1X (Amresco, Solon OH). La matriz se embebió en parafina y los cortes se realizaron con cuchillas de bajo perfil para microtomo (TBS Inc. Carolina del Norte). Para las histologías se emplearon portaobjetos y cubreobjetos (CTR Scientific), hematoxilina monohidratada (MERCK), ácido fosfotúngstico (CTR Scientific), azul de anilina (J.T. Baker), ácido acético (Jalmek), xilol (CTR Scientific), alcohol absoluto (CTR Scientific), alcohol de 96° (CTR Scientific).

**Elaboración de implantes.** Los implantes se elaboraron con alginato (num. cat. A-2158, SIGMA) y cloruro de calcio (C-7902, SIGMA); se emplearon jeringas de plástico (1 mL, 27Gx13 mm, DL MÉDICA, S.A. de C.V. México), agitadores magnéticos y placas de fondo plano de 24 pozos (Corning. Costar City, NY).

Lipectomía, cirugía de implantación y sacrificio de los animales. El material quirúrgico empleado se desinfectó con KRIT (Farmacéuticos Altamirano de México, S.A. de C.V.); en las cirugías se anestesió a los animales con ketamina (Anesket® Vet / Pisa S.A de C.V. México DF, México), xilazina (Procin® Vet / Pisa S.A de C.V. México DF, México) e isoflurano (Isoba® Vet/ Schering Plough. Abbott, Francia) en combinación con oxígeno. Después de la lipectomía se les administró analgésico (Finadyne, Schering Plough Lld. ) y antibiótico (Keflex, Lilly & Co. Indianapolis, Indiana). Se emplearon suturas de ácido poliglicólico y nylon (3-0 VYCRIL Ethicon, Inc.; 3-0 ETHILON™ Nylon Suture, Ethicon, Inc. Somerville, NJ) para cerrar los abordajes. El sacrificio se realizó con una sobredosis de ketamina (Anesket® Vet / Pisa S.A de C.V. México DF, México).

Mantenimiento de los animales. Las 21 hembras se mantuvieron en estabulación y pastoreo libre en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, alimentadas con paca de alfalfa y sorgo 30%/70% a libre demanda.

Pruebas de toxicidad. Para sangre total se emplearon tubos de tapa morada (BD Vacutainer® K2 EDTA 10.8 mg) y para suero tubos de tapa roja (BD Vacutainer® Serum).

Prueba de ELISA. Se empleó el kit Human IGF-I Immunoassay, Quantikine® ELISA (R&D Systems, Inc.) bajo las instrucciones del fabricante; la cuantificación de proteínas totales se realizó mediante Bradford.

### 8.3 Equipos

- Balanza GX-2000 (AND)
- Cabina P-030-202 (C.B.S. Scientific)
- Campana de flujo laminar (Labconco Class II type A2)
- Centrífuga IEC CL10 (Thermo Scientific)
- Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek)
- Incubadora de CO<sub>2</sub> Series 8000 WJ (Thermo Scientific)
- Incubadora MaxQ 4000 (Thermo Scientific)
- Máquina de sedación E-Z anesthecia, (Euthanex Corporation)
- Microcentrifuga 5424 (Eppendorf)
- Microscopio PALM Microimaging GmbH (Carl Zeiss)
- Molino pulverizador K10 (Mezcladora Micrón S.A DE C.V)
- Placa de calentamiento/agitación CIMAREC SP131325 (Thermo Scientific)

- Potenciómetro SevenMull (METTLER TOLEDO)
- PT Module (Thermo Scientific)
- Quirófano de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UANL)
- Termociclador T100™ Thermal Cycler (Biorad)
- Ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter)
- Vortex-Genie®2 (Scientific Industries)

## 8.4 Métodos

8.4.1 Diseño experimental. Las 21 borregas (*Ovis aries*, raza pelibuey) se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos experimentales de 7 animales cada uno, como se muestra en la *Tabla 2*; a todos los animales se les realizó una lesión de 6.35 mm de diámetro y hasta llegar a hueso subcondral en el área del cóndilo medial de la extremidad trasera derecha.

- Grupo 1 (SI). Los animales de este grupo no recibieron tratamiento alguno en la lesión realizada, con la finalidad de observar la regeneración natural del cartílago articular.
- Grupo 2 (I2C). Sobre la lesión realizada a este grupo se colocó un implante con células madre mesenquimales autólogas extraídas de tejido adiposo y matriz natural de cartílago/alginato, denominado como implante de dos componentes (I2C).
- Grupo 3 (I3C). La lesión de este grupo fue tratada con un implante de tres componentes (I3C), compuesto de células madre mesenquimales autólogas extraídas de tejido adiposo, modificadas genéticamente con el factor IGF-1 y embebidas en matriz natural de cartílago/alginato.

|          | SI | I2C | I3C |
|----------|----|-----|-----|
| Borregas | 2  | 3   | 1   |
|          | 5  | 8   | 4   |
|          | 6  | 9   | 7   |
|          | 10 | 13  | 11  |
|          | 12 | 16  | 14  |
|          | 15 | 18  | 19  |
|          | 17 | 21  | 20  |

**Tabla 2.** Distribución de los animales en cada uno de los tres grupos experimentales.

8.4.2 Lipectomías. Los procedimientos quirúrgicos realizados se sometieron a aprobación ante el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario, UANL (BI12-002) bajo el protocolo de investigación que involucra el uso de animales. Las borregas se mantuvieron en ayuno 24 h previas a la extracción del tejido adiposo. Una vez anestesiados los animales con

ketamina, la zona preesternal fue rasurada, desinfectada con yodopovidona sódica y asilada mediante la colocación de un campo estéril. Se realizó una incisión de 5 cm aproximadamente para obtener un fragmento de grasa subcutánea (4-5 g), el cual fue colocado en un tubo estéril con 40 mL de buffer PBS 1X adicionado con antibiótico y antimicótico al 2%. La incisión se suturó con hilo de polipropileno y se trató con una solución de plata cicatrizante; se les administró a los animales una dosis de analgésico y antibiótico antes de colocarlos en una jaula hasta que hubiese pasado el efecto de la anestesia. Las muestras se mantuvieron en hielo desde su toma hasta su procesamiento.

**8.4.3 Aislamiento y cultivo de CMM.** En condiciones de esterilidad el tejido adiposo extraído de la zona preesternal se cortó en fragmentos pequeños sobre una placa de Petri empleando bisturí y pinzas. Los fragmentos fueron sometidos a varios lavados con buffer PBS 1X y antibiótico-antimicótico 2% hasta haber eliminado la mayor cantidad posible de sangre. Después de los lavados el tejido se colocó en un recipiente de plástico estéril que contenía un agitador magnético; al recipiente se añadieron 10 mL de colagenasa I al 0.1% (Anexo 1) y se colocó en agitación suave durante 1.5 h a 37°C. Una vez que el tejido se disgregó, se agregaron al recipiente 2 volúmenes de PBS 1X y se dejó en reposo hasta observar la formación de 2 fases (el sobrenadante con grasa y adipocitos y el infranadante con CMM). El infranadante se recuperó en tubos de 15 mL, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min y se lavó en dos ocasiones con PBS; la pastilla celular obtenido fue resuspendido en medio de cultivo para CMM (Anexo 1) y se sembró en botellas de 25 cm<sup>2</sup> en condiciones de incubación de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 48 h a partir del cultivo, se realizó un subcultivo de las CMM; el sobrenadante fue transferido a botellas de 75 cm<sup>2</sup> para evitar la expansión de tipos celulares distintos a las CMM. Una vez transcurridos 3-5 días a partir del subcultivo, se retiró el sobrenadante y se lavó la monocapa de CMM con PBS, a fin de eliminar eritrocitos, adipocitos y otros tipos celulares no adherentes. Las células se mantuvieron en crecimiento con medio DMEM hasta alcanzar confluencia en la botella de 75 cm<sup>2</sup>.

**8.4.4 Producción, purificación y titulación de vectores adenovirales.** La producción inició con la transducción de una botella de 25 cm<sup>2</sup> con células HEK 293 a 80% de confluencia; el sobrenadante de las células se retiró y se añadió el vector adenoviral, previamente almacenado en congelación, a una MOI de 5 en 1 mL de medio DMEM. Las células se incubaron a 37°C y 5%

CO<sub>2</sub> durante tres h, al cabo de la cuáles se añadieron 3 mL del medio de cultivo y se volvieron a colocar en la incubadora con las condiciones ya mencionadas. Una vez observado el efecto citopático causado por el adenovirus, 16 h post-transducción aproximadamente, las células se desprendieron de la botella de cultivo con un scraper y fueron colectadas en un tubo estéril de 15 mL, donde se lisaron mediante tres ciclos consecutivos de congelamiento a -80°C, descongelamiento a 37°C y 5 segundos de agitación vigorosa. Las partículas virales liberadas se recuperaron centrifugando a 6000 rpm durante 5 min, al cabo de los cuales se obtuvo una pastilla con restos celulares y un sobrenadante con partículas virales. Dicho sobrenadante se empleó para la transducción de una botella de 75 cm<sup>2</sup> y el proceso se repitió con 2, 5, 10 y 20 botellas de 75 cm<sup>2</sup> para pasar a 20 y 35 botellas de 150 cm<sup>2</sup>. El lisado viral obtenido de las 35 botellas de 150 cm<sup>2</sup> se colocó sobre gradientes continuos y discontinuos de cloruro de cesio para ser llevado a ultracentrifugación durante 18 h y el volumen purificado se dializó y almacenó en crioviales a -80°C (Anexo 2). Para determinar la cantidad de partículas virales infecciosas obtenidas se empleó el método de TCID<sub>50</sub>; por triplicado, en placas de 96 pozos, se sembraron 3,000 células HEK-293 por pozo y se transdujeron con diluciones seriadas 1:10 del virus a partir de una alícuota de 100 µL (10<sup>-12</sup>, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>). Dos de las columnas se emplearon como controles de células sin transducir; se colocaron 100 µL de las diluciones adenovirales correspondientes en cada fila (10 repeticiones por dilución) y se incubaron las placas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>; después de 10 días se realizó el conteo de pozos con efecto citopático y se calculó el valor de PFU/mL.

8.4.5 Producción y análisis de matriz de cartílago bovino. A partir de 7 rodillas de res, se obtuvieron lajas de cartílago y se lavaron con PBS 1X. Para el proceso de descelularización física todo el material cartilaginoso obtenido se colocó en un recipiente poroso y se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 min; posteriormente se descongeló a 37°C en agua destilada y se lavó con PBS por 10 min; dicho procedimiento fue repetido 5 veces más. Luego el cartílago se coló y toda la materia sólida se trituyó durante 20 min en licuadora. La masa obtenida se colocó en tubos de 50 mL cubierta con SDS al 2% y se dejó en agitación por 9 hrs a 37°C; el material se lavó con PBS 1X en cuatro ocasiones en intervalos de 30 min. Una vez colada, la masa se separó en bolsas estériles y se liofilizó bajo los parámetros del Banco de Hueso y Tejido de la UANL. El producto liofilizado se molió finamente se separó en bolsas autoadheribles para ser esterilizado con óxido de metileno bajo los parámetros del Banco de Hueso y Tejido. Una fracción del cartílago original

y una muestra del material obtenido después de la esterilización se colocaron en parafina para realizar cortes histológicos y teñirlos con hematoxilina y eosina con el fin de observar los campos descelularizados.

**8.4.6 Preparación de CMM para el implante.** Por duplicado,  $1 \times 10^6$  CMM en segundo pasaje de los animales pertenecientes únicamente a los grupos experimentales 2 y 3 se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos con medio condrogénico (Anexo 1). Para el grupo experimental 2, tratado con el I2C, las células se pre-diferenciaron en monocapa durante 7 días antes de ser utilizadas en la elaboración del implante (I2C). Una vez adheridas, las CMM del grupo experimental 3 fueron transducidas con el vector Ad-IGF-1 a una MOI de 100 y se mantuvieron en cultivo en monocapa durante los 7 días del proceso de pre-diferenciación, previa elaboración del implante (I3C). Durante dicho periodo el medio de cultivo fue periódicamente repuesto, dependiendo de las necesidades de cada grupo de CMM, con 50% del volumen de medio condrogénico nuevo. Las CMM de ambos grupos experimentales se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridos los 7 días, con una confluencia 90%-100% y terminado el periodo de pre-diferenciación *in vitro* las CMM estuvieron listas para realizar los implantes.

**8.4.8 Construcción de los implantes.** Se retiró el medio a cada cultivo de CMM pre-diferenciadas, se lavaron con 2 mL de PBS 1X, se adicionó a cada pozo 2 mL de tripsina 0.35X y se incubaron las placas durante 6 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La tripsina fue inactivada con 2 mL de medio suplementado con 10% de SFB y las células se centrifugaron para obtener tanto la pastilla celular como la MEC sintetizada durante el cultivo en monocapa. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió lentamente con 80 µL de alginato 1.5% (Anexo 1) para evitar la formación de burbujas. La mezcla de CMM/alginato se introdujo en una jeringa estéril de 1 mL con la boquilla previamente cortada y ahí mismo se agregaron 0.01 g de la MCB; mediante el desplazamiento vertical lento del émbolo se mezclaron los componentes del implante. Una vez que la mezcla se observó homogénea, se colocó en agitación moderada en un frasco de vidrio con 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.102M durante 10 min, tiempo en el que el alginato se gelificó totalmente. Se retiró el CaCl<sub>2</sub> y a cada implante se le realizaron dos lavados con PBS 1X durante dos min y un lavado final con medio condrogénico durante 3 min. Los implantes se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos y se cubrieron con medio condrogénico para su maduración *in vitro* durante 21 días. El cambio del 50% del volumen total por medio nuevo se



realizó dependiendo de las necesidades de cada implante, sin que pasaran más de dos días entre cada recambio.

**8.4.9 Producción de IGF-1.** Las muestras analizadas correspondieron al sobrenadante de cada uno de los pozos donde se maduraron los I2C e I3C. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL del medio de cultivo a los 0, 1, 7 y 14 días post-transducción y se almacenaron a -80°C hasta la realización del ensayo de ELISA. Los días previos a la toma del sobrenadante el medio de cultivo se renovó en su totalidad. La cuantificación de proteínas totales se realizó por Bradford para normalizar los datos del ensayo.

**8.4.10 Cirugía de implantación.** Los animales se sometieron a un periodo de ayuno 24 h antes de la cirugía de implantación. Se les administró ketamina (1mL/10 kg) y xilazina (0.5mL/ kg) como pre-anestésico; una vez sedados les fueron colocados un laringoscopio y una sonda intratraqueal para la administración de isofluorano al 5% y oxígeno al 2%. Se realizó un abordaje parapatelar medial a la cápsula articular de la extremidad posterior derecha como explica a continuación: se ubicaron la tuberosidad tibial y la rótula para hacer una incisión recta por la línea media, hasta visualizar el tendón del cuádriceps, la rótula y el ligamento rotuliano. Se separó la expansión del cuádriceps con un bisturí y el panículo adiposo infrapatelar se dividió con el fin de dislocar la rótula lateralmente y exponer el cóndilo medial. Sobre el cóndilo, limpio previamente con una gasa estéril, se realizó una lesión circular con una broca de 6.35 mm de diámetro para remover el tejido cartilaginoso y hasta llegar a hueso subcondral. Los animales pertenecientes al grupo experimental 1 no recibieron tratamiento, de modo que la cápsula sinovial, el músculo y los tendones fueron suturados con ácido poliglicólico, mientras que se empleó una sutura externa de nylon para la piel. A los animales de los grupos experimentales restantes se les colocaron los implantes correspondientes en el área lesionada y sobre el implante se depositó una gota del adhesivo tisular Tisuacryl® para favorecer su adhesión al tejido adyacente; todas las borregas se suturaron una vez terminado el abordaje. Conforme los animales se fueron recuperando de la cirugía recibieron una dosis de analgésico y antibiótico antes de ser llevados a los corrales correspondientes.

**8.4.11 Evaluación de efectos adversos.** Para cada uno de los animales de los grupos 2 y 3 se realizaron dos tomas de sangre proveniente de la vena yugular, una previa a la cirugía de implantación y la segunda 15 días después de la cirugía. En cada toma se llenaron dos tubos de 4



mL, el tubo de tapa morada se empleó para la biometría hemática y el tubo de tapa roja para separar el suero y realizar el perfil de función hepática. En caso de encontrar variaciones entre los valores obtenidos en las pruebas y los reportados como normales se podrían relacionar con efectos adversos debidos al empleo de los vectores adenovirales utilizados en el I3C.

8.4.12 Periodo de observación y sacrificio. Durante las 20 semanas posteriores a la cirugía de implantación los animales se mantuvieron en corrales en estabulación y pastoreo libre. Se monitorearon periódicamente para observar cualquier trastorno en la marcha o anomalía en el movimiento de la extremidad posterior derecha. Una vez transcurrido periodo de observación a partir de la cirugía de implantación los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de ketamina (60 mg/kg). El área de la lesión y el cartílago sano adyacentes fueron fotografiados para el análisis macroscópico antes de ser removidos con un serrucho y colocados en un tubo estéril con 40 mL del fijador tisular (formaldehído 3.7% y glutaraldehído 2.5% en proporciones iguales).

8.4.16 Análisis estadístico. El tamaño de los implantes y la secreción e IGF-1 se analizaron mediante una prueba t de Student para ambos grupos experimentales (I2C vs I3C). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

## CAPÍTULO VIX

### RESULTADOS

#### 9.1 Producción adenoviral

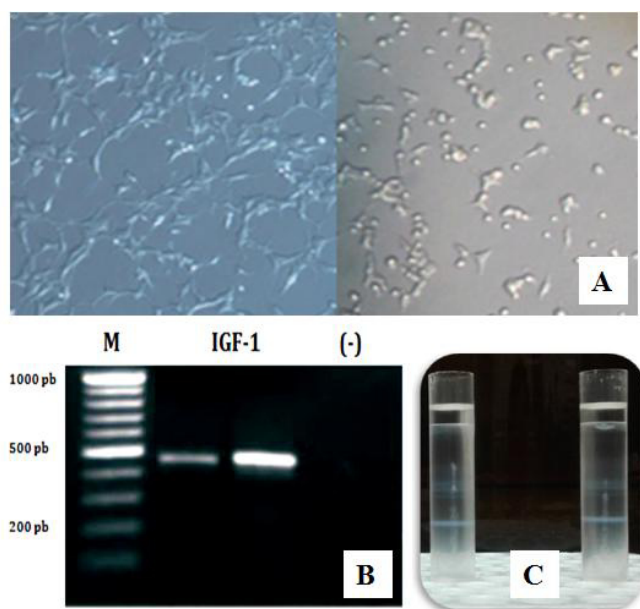
Con una alícuota del vector adenoviral AdIGF-1 se llevó a cabo la transducción de células HEK-293 en una botella de cultivo de 25cm<sup>2</sup>. Transcurridas 18 h desde la transducción se observaron cambios morfológicos en las células indicativos de la presencia del efecto citopático (CPE): algunas de las células se despegaron de la botella de cultivo y la morfología del resto pasó de ser estrellada a una forma redondeada (*Figura 9-A*). Con el sobrenadante obtenido de dicho cultivo se transdujeron 2 botellas de 75 cm<sup>2</sup>; a partir de una de las botellas se extrajo ADN y se realizó la amplificación de un fragmento del gen IGF-1 mediante PCR (*Tabla 3*).

| Gen   | Secuencia 5'-3'                  | Amplicón (pb) |
|-------|----------------------------------|---------------|
| IGF-1 | <i>Fw.</i> GGTGACAGGAAGTCCCAGAA  | 478           |
|       | <i>Rv.</i> AAGGCCATGCCAGTGAGCTTC |               |

**Tabla 3.** Características de los primers empleados en el estudio

Se observó el producto esperado de 478 pb confirmando así la presencia del gen IGF-1 en las células transducidas. Sabiendo con certeza que el efecto citopático de las células se debía a la transducción con AdIGF-1 se procedió con la producción hasta tener 35 botellas de 150 cm<sup>2</sup>. Se realizó la purificación de las partículas virales mediante centrifugación en gradientes de cloruro

de cesio; las bandas obtenidas (*Figura 9-C*) se sometieron a diálisis para eliminar sales y se almacenaron a -80°C.



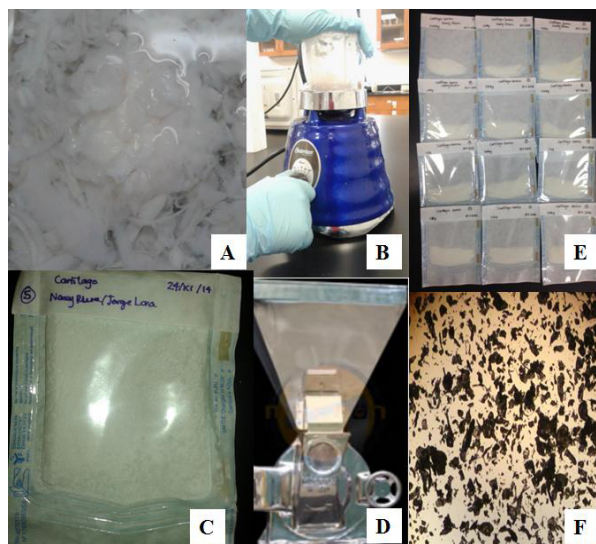
#### Figura 9. Producción del AdIGF-1.

Se llevó a cabo un proceso de producción a gran escala del adenovirus. **A)** Efecto citopático de las células HEK-293 18 horas post-transducción. **B)** Gel de agarosa al 1.5% con el producto amplificado de IGF-1. **C)** Bandas del adenovirus obtenidas después de la centrifugación con CICs.

Se utilizó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  para determinar el título del vector adenoviral; transcurridos los 10 días del ensayo se realizó el conteo de pozos con CPE y se determinó que la producción tuvo un título de  $2.5 \times 10^{11}$  PFU/mL, lo cual fue más que suficiente para la transducción de las CMM.

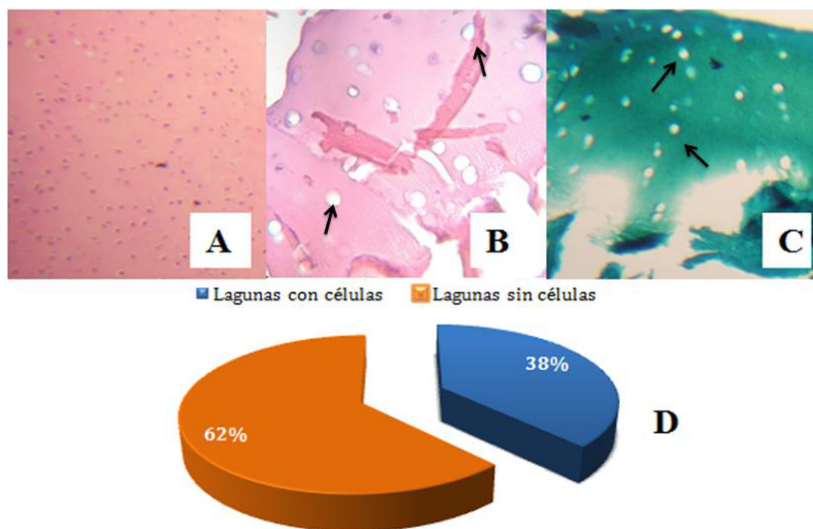
## 9.2 Producción y análisis de la MCB

Para que el andamio de alginato que se utilizó en el estudio tuviera un componente biológico que favoreciera la proliferación celular se incluyó el uso de cartílago bovino, el cual fue previamente descelularizado por métodos fisicoquímicos (*Figura 10*). Partiendo de 7 rodillas de res se generaron 109.9 g de cartílago (peso húmedo). Una vez procesada, se cuantificaron 14.8 g de MCB (peso seco) lista para ser utilizada en la generación de los implantes. El rendimiento de la producción fue del 13.5% y si se considera que cada implante requiere alrededor de 0.01 g para su elaboración, se generó material suficiente para realizar más de 1000 implantes.



**Figura 10. Producción de la MCB.** Mediante métodos fisicoquímicos se obtuvo matriz para la elaboración de los implantes. **A)** Lajas de cartílago bovino **B)** Molienda en húmedo. **C)** Producto seco post-liofilización. **D)** Equipo para molienda fina. **E)** Matriz pulverizada y esterilizada. **F)** Producto final al microscopio (40X) con partículas  $\leq 100\mu\text{m}$

En la *Figura 11* se observan los resultados del análisis de descelularización de la matriz; se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina a un fragmento del cartílago bovino sin procesar y a una muestra de la MCB ya descelularizada, molida y estéril. Asimismo, una muestra de la MCB procesada se tiñó con tricrómico de Gomori. En todas las lagunas del cartílago nativo se observó la presencia de condrocitos (*Figura 11-A*); sin embargo, la MCB presentó una gran cantidad de lagunas sin restos celulares, como se indica con las flechas (*Figura 11-B y 11-C*). La tinción de Gomori (*Figura 11-C*) permitió también identificar en color verde la presencia de colágeno, mostrando que la MCB mantiene la calidad y cantidad de dicho componente.

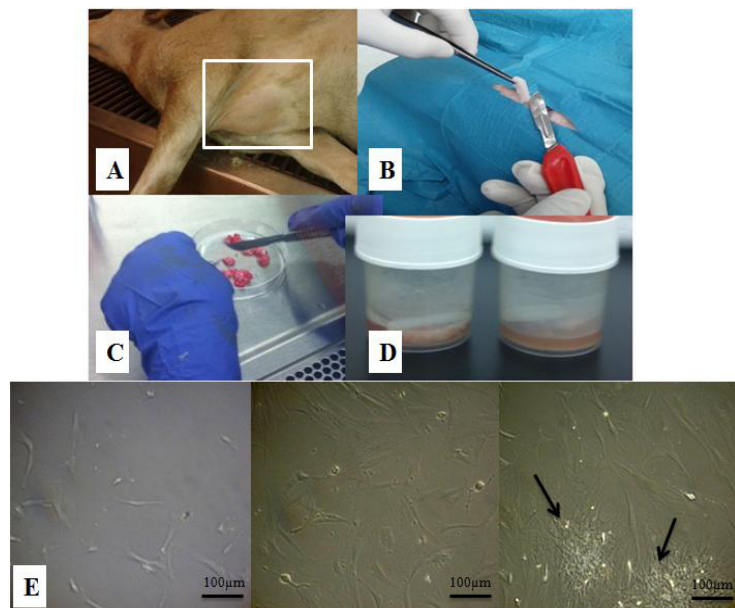


**Figura 11. Análisis de la MCB descelularizada.** Se realizaron tinciones histológicas al tejido para determinar el % de descelularización. A) MCB nativa; tinción con hematoxilina-eosina B) MCB procesada; tinción con hematoxilina-eosina. C) MCB procesada; tinción con Tricrómico de Gomori D) Porcentaje de descelularización de la MCB.

Al realizar el análisis de 250 lagunas, se encontró que el 62% de las mismas no presentó restos celulares, de modo que se obtuvo una matriz parcialmente descelularizada (*Figura 11-D*).

### 9.3 Aislamiento y cultivo de CMM a partir de tejido adiposo

La obtención del tejido adiposo de los 21 animales se realizó sin problema, obteniendo en la mayoría de los casos alrededor de 2 g de grasa (*Figura 12 A-D*). La ISCT (International Society for Cellular Therapy) establece como criterio de selección la capacidad de la células de adherirse a la botella de cultivo; como ya se ha reportado que otros tipos celulares, como los fibroblastos, presentan la característica de adherencia en un menor tiempo, la obtención de las CMM se realizó a partir de un subcultivo de 48 h. La población celular aislada presentó crecimiento sin contratiempos; la morfología durante los



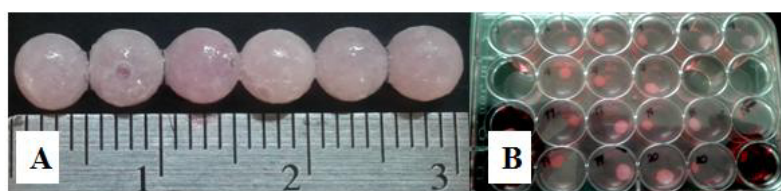
**Figura 12. Aislamiento y cultivo de CMM de ovino.** Las CMM se aislaron de tejido adiposo proveniente de la zona preesternal de los animales. A) Zona preesternal B) Obtención del tejido adiposo C) Disgregación manual del tejido D) Tratamiento enzimático con collagenasa I E) CMM con morfología fibroblastoide y núcleo central a los días 7, 11 y 19 días de cultivo. Las flechas indican colonias características en los cultivos de CMM.

primeros días de cultivo fue estrellada; sin embargo, conforme transcurrió el tiempo y se incrementó la población, las células se observaron más alargadas, con aspecto fibroblastoide y núcleo central.

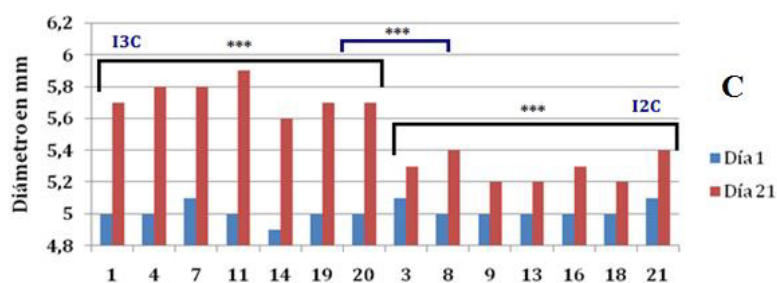
Al cabo de 3 semanas fue posible observar 80% de confluencia en una botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, así como la formación de colonias característica de las CMM. (Figura 12-E)

#### 9.4 Maduración *in vitro* del implante

El periodo de pre-diferenciación condrogénica tuvo una duración de 7 días, durante los cuales las células fueron cultivadas en monocapa. Al término de dicho periodo se observó que en todos los pozos las células presentaron una morfología más redondeada y que la densidad del cultivo se incrementó. Todos los implantes generados (Figura 13-A y 13-B) presentaron una forma esférica y un tamaño de aproximadamente 5 mm de diámetro el día de su



**Tamaño de I2C vs. I3C**



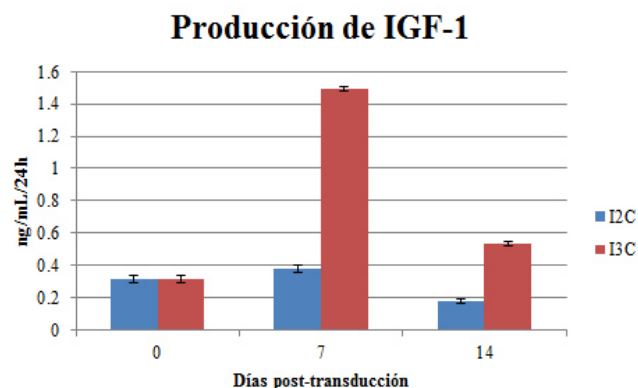
**Figura 13. Generación y análisis de los implantes.** Las CMM se aislaron de tejido adiposo proveniente de la zona preesternal de los animales. A) Morfología esférica de los implantes B) Cultivo de I2C e I3C C) Comparación entre los tamaños finales de ambos grupos experimentales.

elaboración. Después de haber permanecido en cultivo durante 21 días, se realizó nuevamente la medición de su tamaño; como se observa en la Figura 13-C, los implantes del grupo experimental 3 (I3C) mostraron un crecimiento significativamente mayor comparados contra los del grupo experimental 2 (I2C).

#### 9.5 Producción *in vitro* de IGF-1

Para confirmar la sobreexpresión de IGF-1 debida al vector adenoviral, se analizó mediante ELISA su concentración en el sobrenadante de los cultivos. La Figura 14 muestra la comparación entre las cantidades de la proteína producidas en un periodo de 24 h por todos los I2C e I3C (n=14). Los valores basales, evaluados al día cero del cultivo, fueron similares en ambos grupos





**Figura 14. Producción y secreción de IGF-1.**

Análisis de la secreción de IGF-1 por las CMM cultivadas *in vitro* para I2C e I3C. Se observan las diferencias a los 7 y 14 días post-transducción.

haber creado los implantes (día 14 post-transducción) fue evidente la disminución en la cantidad de IGF-1 presente en el medio de cultivo de ambos grupos; en el caso de I2C incluso se observa una disminución por debajo de los niveles basales.

## 9.6 Cirugías de implantación

Las 21 cirugías se realizaron sin complicaciones y los animales no tardaron más de 30 minutos en recuperarse de los efectos de la anestesia. La lesión se hizo en la zona del cóndilo medial y se estandarizó su tamaño mediante el empleo de una broca de 6.35 mm de diámetro. En la *Figura 15-A* se observa la secuencia de imágenes de la formación de la lesión, hasta llegar a cóndilo medial. Mientras que el grupo control fue suturado inmediatamente después de haberse realizado las lesiones, los grupos 2 y 3 fueron tratados, respectivamente, con los I2C e I3C madurados durante 21 días.

Al momento de colocar los implantes en la zona de la lesión articular del segundo grupo experimental (*Figura 15-B*) fue evidente que la consistencia de los I2C era más friable con respecto a la de los I3C. Durante su manipulación, como se indica con una flecha en la figura, los I2C tendieron a desintegrarse y perder fácilmente su forma esférica. Por esa razón fue necesario colocar encima de ellos un apósito de alginato de calcio comercial (CalciCare) con el fin de mantenerlos en el sitio de la lesión, y que el implante no se perdiera por disgregación a tejido adyacente. Los I3C (*Figura 15-C*) tuvieron una consistencia mucho más firme, que permitió su manipulación y colocación sobre la lesión sin que su forma original sufriera alteraciones, como se indica con una flecha. Terminado el periodo de observación post-quirúrgica (48 h), los animales

experimentales. Al séptimo día post-transducción, previo a la elaboración de los implantes, se observó un incremento en las concentraciones de IGF-1 secretadas en ambos grupos; sin embargo, mientras que el incremento en I2C no es significativo, la diferencia vs los valores de la proteína al día 0 es mucho mayor en I3C, donde la cantidad de IGF-1 reflejó un incremento de 4 veces sobre el nivel basal. Siete días después de

se llevaron a una zona de libre pastoreo para determinar la presencia de alteraciones de la marcha, movimientos anormales en la extremidad o signos de inflamación (*Figura 15-D*).

Únicamente en uno de los animales, perteneciente al grupo experimental 3, se observaron signos anormales durante la marcha cuando habían transcurrido 10 días desde el procedimiento quirúrgico. Durante el tiempo restante de observación y estabulación, el animal no dio muestras de apoyar su peso sobre la extremidad posterior que fue tratada.

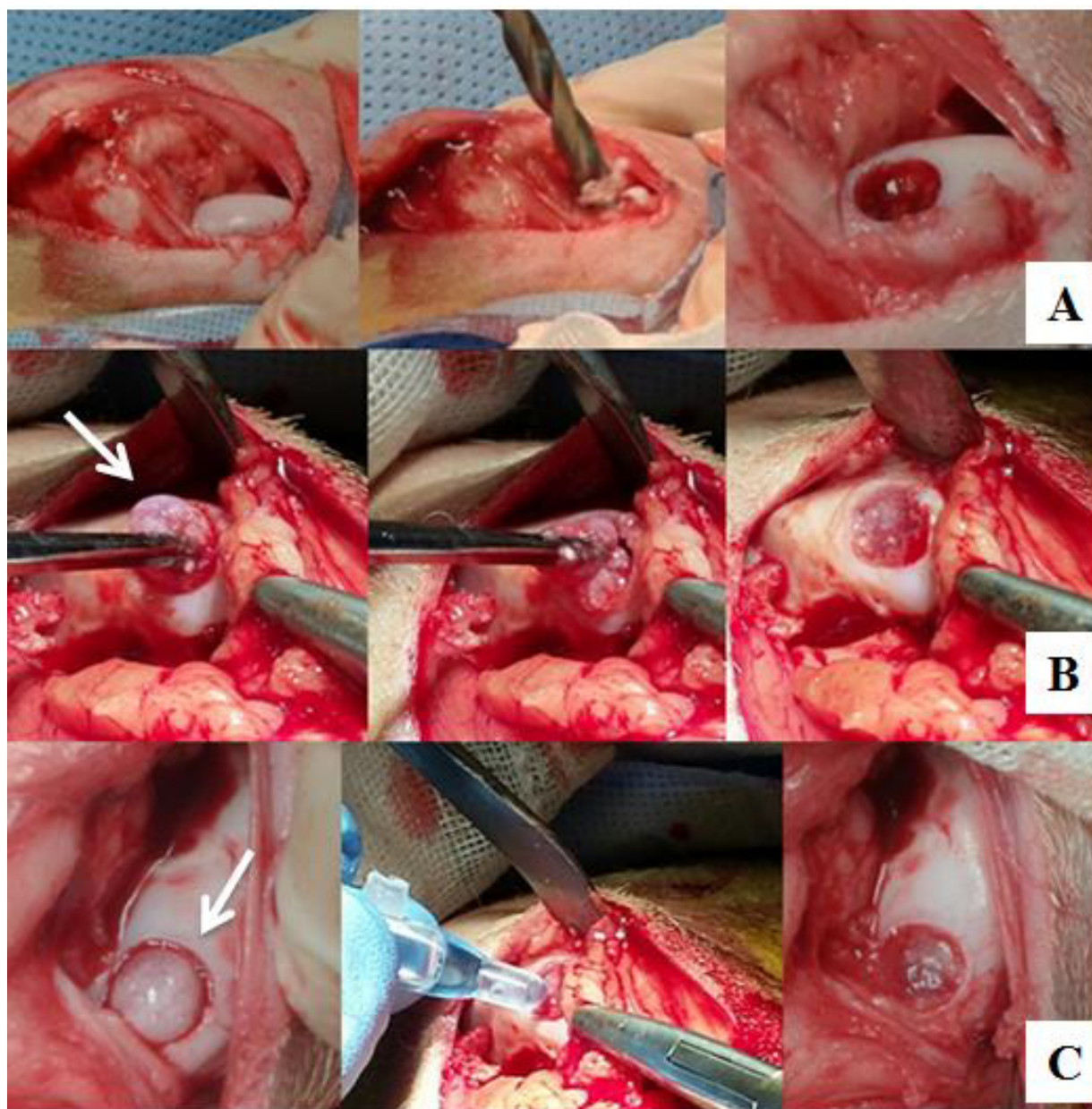
### **9.7 Toxicidad derivada del uso del vector adenoviral en el modelo animal**

A los animales tratados con los I3C les fueron extraídas muestras sanguíneas para la evaluación de la función hepática. La primera toma se realizó previa la intervención quirúrgica, mientras que la segunda toma se llevó a cabo 15 días posteriores a las cirugías de implantación. Los resultados de este análisis no mostraron alteraciones como consecuencia del empleo de los vectores adenovirales en el implante.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 4*, donde los valores se presentan como el promedio y desviación estándar de los siete animales; además se incluyen los valores de referencia normales reportados para ovinos. En los resultados de las biometrías hemáticas todos los valores se encuentran dentro de los rangos normales, tanto antes como después de la cirugía. En cuanto a los resultados de los perfiles de función hepática, los valores pre y post-quirúrgicos de la albúmina estuvieron por encima de los rangos de referencia, mientras que los de la globulina estuvieron por debajo. El resto de las enzimas evaluadas en la prueba de función hepática no muestran alteraciones evidentes respecto a los niveles normales.

### **9.8 Análisis macroscópico de las lesiones**

Los animales fueron sacrificados después de un periodo de observación de 20 semanas; se realizó un abordaje similar al de la cirugía de implantación para recuperar los cóndilos. En la *Figura 16* se muestran las 21 imágenes correspondientes a las lesiones realizadas en los tres grupos experimentales (control negativo, I2C e I3C), así como una imagen de un cóndilo sano (control positivo). La mayoría de las lesiones, independientemente del grupo experimental, no fueron cubiertas hasta la superficie del cartílago adyacente; sin embargo, en muchas de las imágenes se observa, por lo menos, una cobertura parcial.



**Figura 15. Cirugías de implantación.** Se observa el abordaje de la lesión y el tratamiento que recibieron los grupos experimentales. **A)** Generación del daño al cóndilo medial **B)** Tratamiento de la lesión con I2C **C)** Tratamiento de la lesión con I3C **D)** Estabulación post-quirúrgica





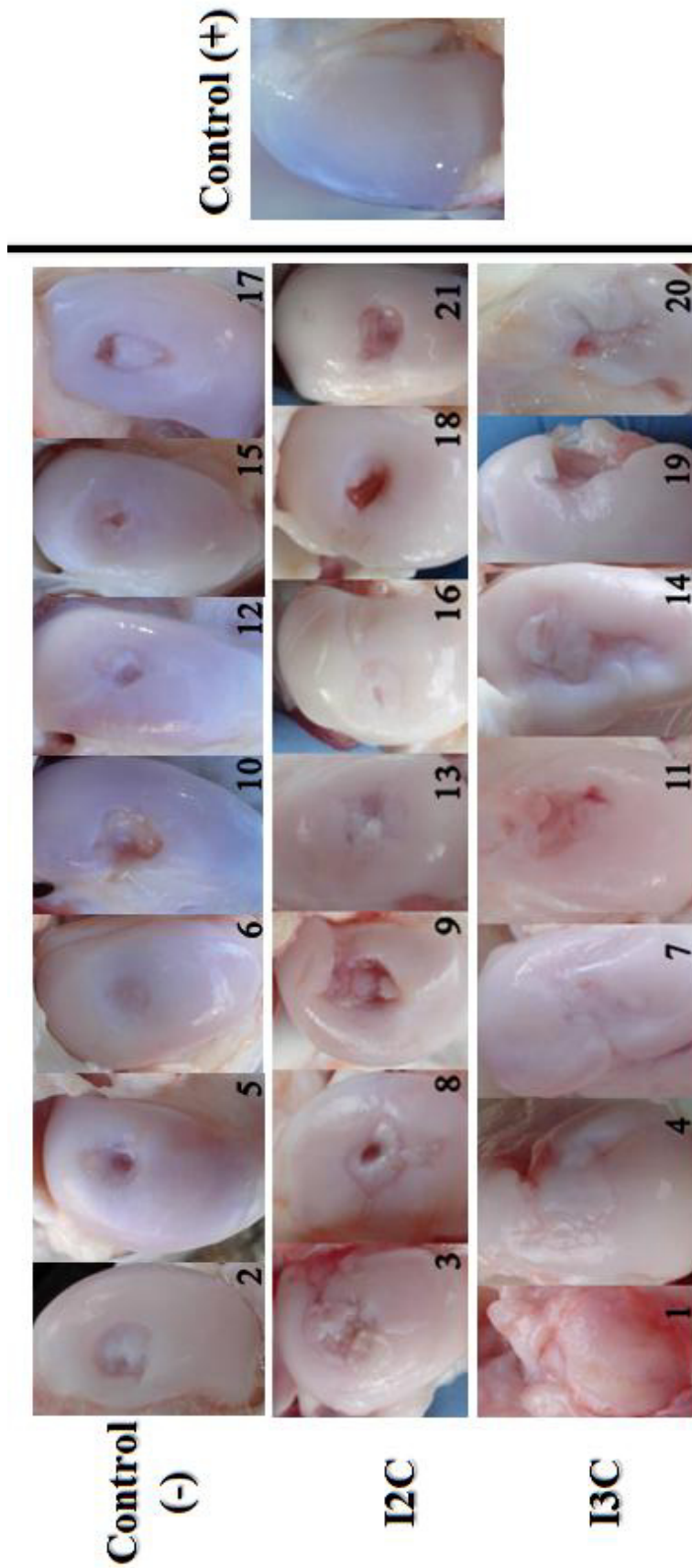
|                           | Pre-quirúrgico  | Post-quirúrgico | Referencia               |
|---------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| <b>Leucocitos</b>         | 5.71 ± 2.14     | 9.25 ± 3.21     | 4-12 10 <sup>3</sup> /mL |
| <b>Hemoglobina</b>        | 11.31 ± 1.26    | 11.43 ± .067    | 8-16 g/L                 |
| <b>Plaquetas</b>          | 394.34 ± 135.15 | 130.5 ± 55.49   | 100-800 mL               |
| <b>P. Totales</b>         | 7.16 ± 0.41     | 6.44 ± 0.26     | 5.4-7.8 g/dL             |
| <b>Albúmina</b>           | 4.25 ± 0.33     | 3.65 ± 0.48     | 2.4-3.7 g/dL             |
| <b>Globulina</b>          | 2.9 ± 0.44      | 2.79 ± 0.58     | 3.4-5.5 g/dL             |
| <b>ALT</b>                | 14.14 ± 10.51   | 14.29 ± 1.5     | 5-44 U/L                 |
| <b>AST</b>                | 103.86 ± 62.53  | 88.14 ± 16.22   | 49-123 U/L               |
| <b>Fosfatasa Alcalina</b> | 122.43 ± 36.45  | 177 ± 45.21     | 68-387 U/L               |
| <b>B. Total</b>           | 0.1             | 0.1             | 0.1-0.3 mg/dL            |
| <b>B. Directa</b>         | 0.043 ± 0.02    | 0.013 ± 0.005   | 0.0-0.3 mg/dL            |
| <b>B. Indirecta</b>       | 0.057 ± 0.02    | 0.087 ± 0.005   | 0.0-1.0 mg/dL            |

**Tabla 4.** Perfiles de función hepática y biometrías hemáticas de borregos

Cabe destacar el caso de la borrega #1, que fue el único animal con alteraciones fisiológicas después de la cirugía y cuya articulación se observó completamente deformada y cubierta por tejido de características fibrosas. Como no fue posible determinar la zona donde se realizó la lesión y se colocó el implante, en la *Figura 16* se muestra una fotografía del tejido encontrado en la zona donde normalmente se localiza el cóndilo medial.

En el grupo 1 se observó la regeneración natural del cartílago, partiendo del tejido sano adyacente hacia el centro de la lesión. El mejor resultado macroscópico es del animal #6, donde únicamente la zona central de la lesión no alcanzó a ser cubierta en su totalidad por tejido nuevo. El resto de los animales tuvieron diferentes grados de reparación tisular, siempre empezando por el tejido preexistente.

Los mejores resultados del grupo 2 se observaron en los animales #13 y #16, donde las lesiones se apreciaron cubiertas casi al límite del cartílago adyacente. El resto de los animales presentó, al igual que el grupo 1, distintos grados de formación de cartílago *de novo*. Sin embargo, a simple vista no se detectó una diferencia significativa entre ambos grupos.



**Figura 16. Análisis macroscópico después de 20 semanas de tratamiento.** Se muestran las fotografías de los cóndilos al momento del sacrificio. Los resultados para cada grupo experimental se acomodaron horizontalmente y en la esquina inferior derecha se indica el número de animal evaluado. Se muestra una imagen de un cóndilo sin lesión como control positivo del estudio.

Las lesiones del grupo 3, tratadas con el I3C, se observaron significativamente más cubiertas con tejido de apariencia similar al cartílago adyacente, que los otros grupos experimentales. Sin embargo, en todos los animales se observó que las superficies de los cóndilos sufrieron cambios morfológicos alrededor de la zona de lesión (apariencia de pliegues). En el caso del animal #19 se detectó la ausencia de un fragmento del cóndilo justo al lado del sitio de reparación.

El tejido con el que se rellenaron las lesiones de los tres grupos experimentales se observó de color blanquecino y traslúcido, con morfología y textura al tacto muy parecidas a las del cartílago natural contiguo.

## CAPÍTULO X

### DISCUSIÓN

La técnica empleada para la descelularización de la MCB consistió en un protocolo modificado<sup>83</sup> y probado previamente por nuestro equipo de investigación. La matriz obtenida por Moncada-Saucedo<sup>84</sup> presentó un 54% de lagunas sin restos celulares y al ser utilizada en un estudio piloto *in vivo* no hubo evidencias de que causara efectos adversos en los animales<sup>85</sup>. El porcentaje de descelularización del cartílago bovino obtenido fue del 63%; aunque dicho porcentaje no es tan alto como el reportado por algunos métodos enzimáticos<sup>86,87,88</sup>, la matriz porosa obtenida permitió elaborar implantes donde ocurrieron proliferación de células pre-condrocíticas y producción de MEC. Asimismo, la presencia de fibras de colágeno, observada mediante la tinción con Tricrómico de Gomori, es evidencia de que la MEC se conservó después del procesamiento de la MCB.

El ensayo de ELISA permitió confirmar que las CMM empleadas en la elaboración de los I3C (transducidas con el vector adenoviral) produjeron mayor cantidad de IGF-1 que las empleadas en los I2C, los días 7 y 14 después de la transducción. El adenovirus estimuló diferencialmente la producción de la proteína en las células del grupo 3, en comparación con el grupo no transducido. Es probable que la caída en los valores de IGF-1 secretado al medio de cultivo el día 14 en ambos grupos se deba a que durante la elaboración del implante la viabilidad celular se reduce hasta en un 50%<sup>84</sup>. A pesar de la reducción en la cantidad de células viables en el implante, se observó que el día 14 la expresión de IGF-1 siguió siendo mayor que los niveles basales. Se ha reportado que al cabo de 14 días la expresión de los genomas adenovirales se sigue llevando a cabo en células con tiempos de duplicación de 24 h<sup>110-112</sup>. Lo anterior explica los valores elevados de IGF-1 en el medio de cultivo del tercer grupo experimental; puesto que las CMM tienen un tiempo de duplicación mayor a 24h, el adenovirus presente, aunque más diluido, sigue siendo capaz de inducir la sobreexpresión de IGF-1.

Los análisis microscópicos de I2C e I3C demostraron que existe interacción entre las CMM y la matriz cartilaginosa empleada en la elaboración de los implantes<sup>84</sup>. Dicha interacción entre células y componentes biológicos es indispensable para favorecer la producción de la MEC<sup>89</sup> y permite explicar el aumento en el tamaño de los implantes durante el periodo de maduración *in*

*vitro*. Es probable que el incremento significativo del tamaño de los I3C, comparado con los I2C, se deba al aumento en la producción de MEC en los implantes donde se utilizaron células transducidas con AdIGF-1. Como IGF-1 no sólo estimula la vía condrogénica mediante PI3K-HIF-1 $\alpha$ <sup>90</sup>, sino que también evita la degradación de la MEC mediante la inhibición de MMP-13<sup>91</sup>, su uso habría permitido una mayor diferenciación de las CMM hacia condrocitos y menor pérdida natural de la MEC producida. Además de la diferencia de tamaño entre I2C e I3C, la consistencia de los implantes también se vio diferencialmente influida por la producción de MEC; mientras que los implantes del segundo grupo experimental tuvieron una consistencia friable y se desintegraron durante su manipulación, los I3C mantuvieron su forma sin problema.

En las cirugías de ambos grupos experimentales se empleó el adhesivo tisular cianoacrilato de N-butilo (Tisuacryl®) para mantener en su lugar a los implantes; sin embargo, en los animales tratados con I2C, también fue necesario utilizar un apósito de alginato de calcio (CalciCare®) para mantener el implante en el sitio de la lesión. Ambos materiales han sido empleados previamente en protocolos que involucran el tratamiento de lesiones condrales y osteocondrales *in vivo* sin que se reporten efectos negativos relacionados con su uso<sup>92-98</sup>.

Después de analizar los resultados de las biometrías hemáticas y pruebas de función hepática se descartaron posibles efectos citotóxicos del tratamiento por el empleo del vector AdIGF-1. Los valores ligeramente incrementados en la albúmina pueden ser consecuencia de la restricción en la ingesta de alimento y agua de los animales antes de la toma de muestra<sup>99</sup>. Asimismo, se ha reportado que el decremento en la producción de globulina en animales de cría se debe al tipo de dieta a la que se ven sometidos<sup>100,101</sup>.

Uno de los animales presentó niveles elevados de AST y disminuidos de globulina en las pruebas pre-quirúrgicas (240 U/L y 2 g/dL respectivamente); sin embargo, ambos parámetros estuvieron dentro de los rangos normales para los análisis post-quirúrgicos y dichas alteraciones se han asociado previamente a enfermedades gastrointestinales<sup>102</sup>.

El tamaño de la lesión realizada en el cóndilo de los animales fue de 6.35 mm de diámetro; esto coincide con reportes de que, en el modelo animal ovino, el tamaño ideal de las lesiones está entre 6 y 7 mm, llegando a encontrarse en la literatura casos que van de 4-15 mm.<sup>75, 103</sup>

En las imágenes macroscópicas se observó la presencia de un proceso de reparación tisular en curso en la mayoría de los animales. Aunque en algunos casos, sobretudo en el grupo tratado

con el I3C, el cartílago generado cubrió casi por completo la zona de lesión después de un tiempo de observación de 20 semanas, es aconsejable incrementar dicho periodo por lo menos 4 semanas más, ya que en el modelo ovino se recomiendan tiempos de observación de al menos 6 meses.<sup>104-108</sup>

Las características anatómicas de la articulación del borrego que presentó alteraciones en la marcha (borrega #1) se asemejan al desarrollo de artrofibrosis; la síntesis excesiva de tejido fibroso y colágenos tipo I, III y IV se presenta como consecuencia de traumatismos o complicaciones post-quirúrgicas<sup>109</sup>. Sin embargo, es necesario analizar la arquitectura microscópica del tejido para dilucidar las razones del resultado observado en este animal.

Aunque en las imágenes macroscópicas es evidente que el grupo tratado con el I3C mostró mayor producción de tejido en la zona dañada, es necesario realizar las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas y realizar la evaluación de la escala de O'Driscoll para determinar con certeza el tipo de colágeno, los componentes esenciales de la MEC presentes en el tejido nuevo y la idoneidad del implante empleado en el grupo experimental.

## **CAPÍTULO XI**

### **CONCLUSIONES**

Tomando en cuenta únicamente los resultados macroscópicos, las lesiones tratadas con el I3C se observaron más reparadas que los demás grupos experimentales. Después de 20 semanas de tratamiento, en el área donde se realizó la lesión condral se observó la generación de un tejido más similar al cartílago sano y que cubre casi la totalidad la lesión.

## CAPÍTULO XII

### PERSPECTIVAS

- Realizar los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos de las zonas de lesión y emplear la escala de regeneración histológica O'Driscoll para evaluar las diferencias entre los resultados.
- Realizar un análisis bioquímico de los GAGs presentes en I2C e I3C.
- Evaluar la resistencia a compresión de los implantes maduros.
- Colocar en un mismo animal I2C e I3C con la finalidad de disminuir la variabilidad en los resultados debida a características propias de cada organismo.
- Realizar el seguimiento del proceso regenerativo *in vivo* en intervalos de tiempo para evaluar la evolución en la reestructuración tisular del cartílago mediante técnicas de imagen diagnóstica (artroscopía, resonancia magnética).
- Obtener muestras del líquido sinovial para verificar que no exista un proceso inflamatorio en el área adyacente a la lesión.



## CAPÍTULO XIII

### BIBLIOGRAFÍA

1. Louw QA, Manilall J, Grimmer KA. Epidemiology of knee injuries among adolescents: a systematic review. *Br J Sports Med.* 2008; 42(1):2-10.
2. Martin JA, Brown T, Heiner A, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence.. *Biorheology* 2004; 41 (3-4) :479-91.
3. Vaquero J, Forriol F. Knee chondral injuries: clinical treatment strategies and experimental models. *Injury.* 2012; 43:694-705.
4. Qi Y, Feng G, Yan W. Mesenchymal stem cell-based treatment for cartilage defects in osteoarthritis. *Molecular biology reports*; 2012; 39, 5683-9.
5. Cohen ZA, McCarthy DM, Kwak SD, Legrand P, Fogarasi F, Ciaccio EJ, Ateshian GA. Knee cartilage topography, thickness, and contact areas from MRI: in-vitro calibration and in-vivo measurements. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999; 7(1):95-109.
6. Moore KL, Persaud TVN. El sistema esquelético. *Embriología Clínica-El desarrollo del ser humano.* Séptima edición. Elsevier, Canadá; 2004:381-398.
7. Meyer U, Wiesmann HP. Cartilage structure and function. *Bone and cartilage engineering.* Primera edición. Springer, Alemania; 2006:25-29.
8. Johnson KE. Cartilage and bone-Histology and cell biology. Segunda edición. Williams & Wilkins, EUA; 1991:107-122
9. Knight M, Wang C, Pacifici M, Fernandez P. Development of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21, S2-S3.
10. Sophia-Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health.* 2009;1(6):461-468.
11. Bentley G, Minas T. Treating joint damage in young people. *BMJ* 2000; 320:1585-1588.
12. Sopena-Juncosa J, Carrillo-Poveda J, Rubio-Zaragoza M, Redondo-García J, Serra-Aguado A, Soleri-Canet I. Estructura y función del cartílago articular. *Armas frente a la Patología Articular.* 24-26
13. Boschetti F, Miotti C, Massi F, Colombo M, Quaglini V, Perett GM, Pietrabissa R. An Experimental Study on Human Articular Cartilage Permeability. *Proceedings of the Second Joint EMBS/BMES USA Conference.* 2002; 23-26.
14. Chan B, Bonzelli PS, Spilker RL. Mechanical Behavior of Articular Cartilage. *Annals of Biomedical Engineering.* 2000; 28:589-597
15. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998; 47:477-486.
16. Glant TT, Hadhazy C, Mikecz K, Sipos A. Appearance and persistence of fibronectin in cartilage - Specific interaction of fibronectin with collagen type II. *Histochemistry.* 1985; 82:149-158.
17. Kirsch T, Pfäffle M. Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). *FEBS Lett.* 1992; 310(2):143-147.
18. Enomoto M, Leboy P, Menko A, Boettiger D. Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res.* 1993; 205:276-85.
19. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008; 87:77-95.
20. Andriacchi TP, Mündermann A, Smith RL, Alexander EJ, Dyrby CO, Koo S. A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. *Annals of Biomedical Engineering.* 2004; 32:447-457.
21. Demoor *et al.* Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 2414-2440.

22. Rodríguez-Merchán EC. Regeneration of Articular Cartilage of the Knee: Basic Concepts. DOI10.1007/978-88-470-2727-5\_1
23. Flik KR, Verma N, Cole BJ, Bach BR. Articular Cartilage: structure, biology, and function. Primera edición. Humana Press, EUA; 2007: 1-23.
24. Redma SM, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur. Cells mater.* 2005; 44:23-32.
25. Cucchiari M, Madry H, Guilak F, Saris DB, Stoddart MJ, Koon-Wong M, Roughley P. A vision on the future of articular cartilage repair. *European Cells and Materials.* 2014; 27:12-16.
26. Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics.* 1997; 20:525-538.
27. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee.* 2007; 14:177-182.
28. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* 2006. 10(3):569-576.
29. Jackson DW, Simon TM. Tissue engineering principles in orthopaedic surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 1999; 31-45.
30. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The Loss of Phenotypic Traits by Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1960; 46:1533-1542.
31. Brodtkin KR, García AJ, Levenston, ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials.* 2004; 25, 5929-38.
32. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Re.* 1998; 240:58-65.
33. Ahmed TA, Hincke MT. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histology and Histopathology,* 2014; 29(6):669-689
34. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res.* 2005; 308:283-290.
35. Locke M, Windsor J and Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ Journal of Surgery.* 2009; 79: 235-244.
36. Erickson GR *et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 290:763-769.
37. Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *Journal of internal medicine.* 2009; 266: 390-405.
38. Docheva D, Haasters F, Schieker M. Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors. *Curr. Rheumatol.* 2008; 4:155-160.
39. Darwin J. Prockop, D.G.P., Bruce A. Bunnell Mesenchymal stem cells. *Methods and Protocols.*, 197 (Humana Press: 2008).
40. Duprez DM, Coltey M, Amthor H, Brickell PM, Tickle C. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev Biol.* 1996; 174:448-452.
41. Abula K *et al.* Elimination of BMP7 from the developing limb mesenchyme leads to articular cartilage degeneration and synovial inflammation with increased age. *Federation of European Biochemical Societies.* 2015; 589(11):1240-1248.
42. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:763-769.
43. Goldring, MB *et al.* The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry.* 2006; 97, 33-44.
44. Bush JR, Beier F. TGF- $\beta$  and osteoarthritis: the good and the bad. *Nature Medicine.* 2013; 19:667-669.

45. Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im HJ. Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:3910-3917.
46. Shanmugarajan T, Kim B, Lee H, Im G. Growth Factors and Signaling Pathways in the Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Regen. Med.* 2011; 8:292-299.
47. Cleary MA et al. Embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013; DOI: 10.1002/term.1744
48. Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JMS. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends in Biotechnology.* 2014; 1216:1-8.
49. Guérit D, Djouad F, Maumus M, Bony C, Jorgensen C, Noël D. Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering.* 2012; 2(1):29-39.
50. Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol.* 2008; 8:213-219.
51. Cucchiari M, Orth P, Madry H. Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. *J Mol Med.* 2013; 91:625-636.
52. Fortier L, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clinical orthopaedics and related research.* 2011; 469:2706-2715.
53. Longo UG, Petrillo S, Franceschetti E, Berton A, Maffulli N, Denaro V. Stem Cells and Gene Therapy for Cartilage Repair. *Stem Cells International.* 2012; doi: 168385.
54. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Arthritis Gene Therapy and its Tortuous Path into the Clinic. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 2013; 161(4):205-216.
55. Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in Gene Therapy for Cartilage Repair. *Injury.* 2008; 39(1):97-113.
56. Liu TM. Gene Therapy for Articular Cartilage Repair. *Pharmaceut Anal Acta.* 2012; 3:5.
57. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Herndon JH, Kang R, et al. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther.* 1996; 7:1261-1280.
58. Cucchiari M, Madry H. Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Therapy.* 2014; 21:811-819.
59. Orved KF, Begum L, Mohammed HO, Nixon AJ. Implantation of rAAV5-IGF-I Transduced Autologous Chondrocytes Improves Cartilage Repair in Full-thickness Defects in the Equine Model. *Molecular Therapy.* 2014; doi:10.1038/mt.2014.198
60. Madry H, Kaul G, Zurakowski D, Vunjak-Novakovic G, Cucchiari M. Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *European Cells and Materials.* 2013; 25:229-247.
61. Ge Z, Li C, Heng BC, Cao G, Yang Z. Functional biomaterials for cartilage regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2012; 100(9):2526-2536.
62. Cao Z, Dou C, Dong S. Scaffolding Biomaterials for Cartilage Regeneration. *Journal of Nanomaterials.* 2014; doi:489128.
63. Danisovic L, Varga I, Zamborsky R. The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors. *Experimental Biology and Medicine.* 2012; 237(1):10-17.
64. Noeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2012; 16(10):2247-2270.
65. Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F. The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSC. *Biomaterials.* 2013; 34(23):5802-5812.

66. Hamley IW. Hydrogels in Cell-Based Therapies. Primera edición. Royal Society of Chemistry, Inglaterra. pp.141-148.
67. Yang W, Lee S, Jo YH. Effects of natural cartilaginous extracellular matrix on chondrogenic potential for cartilage cell transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2014; 46(4):1247-1250.
68. Erickson IE, Zellars KH, Kestle SR, Burdick JA, Mauck RL. Dynamic Compression Promotes Cartilage-Like Functional Properties in MSC-Seeded Hyaluronic Acid Hydrogels. *ASME Summer Bioengineering Conference*. 2011; doi:10.1115/SBC2011-53661
69. Huang AH, Farrell MJ, Mauck RL. Delayed Dynamic Compression Improves the Mechanical Properties of MSC-Laden Constructs. *Biomedical Engineering Society Meeting*. 2009.
70. Kim YJ, Sah RLY, Grodzinsky AJ, Plaas AHK, Sandy JD. Mechanical Regulation of Cartilage Biosynthetic Behavior: Physical Stimuli. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994; 311(1):1-12.
71. Kupcsik L, Stoddart MJ, Li Z, Benneker LM, Alini M. Improving Chondrogenesis: Potential and Limitations of SOX9 Gene Transfer and Mechanical Stimulation for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. 2010;16(6):1845-1855.
72. Terraciano V, Hwang N, Moroni L, Park HB, Zhang Z, Mizrahi J, Seliktar D, Elisseeff J. Differential Response of Adult and Embryonic Mesenchymal Progenitor Cells to Mechanical Compression in Hydrogels. *Stem cells*. 2007;25:2730-2738.
73. Kisiday JD, Frisbie DD, McIlwraith CW, Grodzinsky AJ. Dynamic Compression Stimulates Proteoglycan Synthesis by Mesenchymal Stem Cells in the Absence of Chondrogenic Cytokines. *Tissue Engineering*. 2009;15(10):2817-2824.
74. Fortier LA, Cole BJ, McIlwraith CW. Science and animal models of marrow stimulation for cartilage repair. *The Journal of Knee Surgery*. 2012; 25(1):3-8.
75. Cook JL *et al.* Animal models of cartilage repair. *Bone Joint Res*. 2014;3(4):89-94.
76. Hunziker EB. Biologic Repair of Articular Cartilage: Defect Models in Experimental Animals and Matrix Requirements. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1999;367:S135-S146.
77. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:705-713.
78. Hurtig MG, Buschmann MD, Fortier LA. Preclinical studies for cartilage repair: recommendations from the ICRS. *Cartilage*. 2011;2:137-152.
79. Guillén-García P, Rodríguez-Iñigo E, Guillén-Vicente I, Caballero-Santos R, Guillén-Vicente M, Abelow S, Giménez-Gallego G, López-Alcorocho JM. Increasing the Dose of Autologous Chondrocytes Improves Articular Cartilage Repair: Histological and Molecular Study in the Sheep Animal Model. *Cartilage*. 2014; 5(2):114-122.
80. Bellemans J. Osseointegration in porous coated knee arthroplasty. The influence of component coating type in sheep. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1999;288:1-35.
81. Paquet J. Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition génomique et transcriptionnelle du TNF alpha par une approche de type oligonucléotidique. 2010
82. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 97:33-44.
83. Tavassoli A, Mahdavi-Shahri N, Matin MM, Fereidoni M, Shahabipour F. Bovine articular cartilage decellularized matrix as a scaffold for use in cartilage tissue engineering. *The Iranian Journal of Veterinary*. 2012;4(1):1-8.
84. Moncada-Saucedo N. Desarrollo de un implante cultivado de CMM transducidas con IGF-1 en una matriz de cartílago natural. UANL. 2014
85. Galván-delosSantos A. Análisis de un Implante para Cartílago de Células Madre Mesenquimales Modificadas Genéticamente con Factores Condrogénicos en *Ovis aries*. UANL. 2014.
86. Chang CH, Chen CC, Liao CH, Lin FH, Hsu YM, Fang HW. Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102:2248-2257.

87. Sutherland AJ, Beck EC, Dennis SC, Converse GL, Hopkins RA, Berklund CJ. Decellularized Cartilage May Be a Chondroinductive Material for Osteochondral Tissue Engineering. *PLoS ONE*. 2015;10(5): e0121966.
88. Singh S, Afara IO, Tehrani AH, Oloyede A. Effect of Decellularization on the Load-Bearing Characteristics of Articular Cartilage Matrix. *Tissue Eng Regen Med*. 2015;12(5):294-305.
89. Fisher JP, Yoon DM. Chondrocyte Signaling and Artificial Matrices for Articular Cartilage Engineering. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007;585(2): 67-86.
90. Gelse K, Pöschl E, Aigne T. Collagens: structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55:1531-1546.
91. Zhang M1, Zhou Q, Liang QQ, Li CG, Holz JD, Tang D, Sheu TJ, Li TF, Shi Q, Wang YJ. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(1):100-106
92. Alio JL, Mulet ME. Bioadhesives in Surface Disorders. Primera edición; 2013. JP Medical Ltd, India. pp. 317-324
93. Febles-Lebrigos O, Corzo-Febles AJ, Domínguez-Ganen I, Collazo-Zulueta MA. Tissue adhesive Tisuacryl as a suture substitute in soft tissues autografts. *Revista de Ciencias Médicas de la Habana*. 2012; 18(2):204-210
94. Rodríguez-Aparicio A, Rodríguez-Calzadilla OL, Pérez-Pérez O. Results in the application of tissue adhesive in traumatic and surgical wounds. *Revista de Ciencias Médicas de la Habana*. 2012; 18(2):176-185
95. Zhu S, Zhang T, Sun C, Yu A, Qi B, Cheng H. Bone marrow mesenchymal stem cells combined with calcium alginate gel modified by hTGF- $\beta$ 1 for the construction of tissue-engineered cartilage in three-dimensional conditions. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013;5:95-101.
96. Guo Y, Ma Y, Dong R, Liu S, Tu J. Effect of allogeneic chondrocytes-calcium alginate gel composite under intervention of low intensive pulsed ultrasound for repairing rabbit knee articular cartilage defect. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*. 2013;27(8):928-34.
97. Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martínez-Ávila H, Hägg D, Gatenholm P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*. 2015;16(5):1489-1496.
98. Wang CC, Yang KC, Lin KH, Liu YL, Liu HC, Lin FH. Cartilage regeneration in SCID mice using a highly organized three-dimensional alginate scaffold. *Biomaterials*. 2012;33(1):120-127.
99. Binev R, Slavova L, Laleva S. Effects of fasting on blood cells from lambs of various breeds. *Trakia Journal of Sciences*. 2006;4(3):37-43.
100. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's Veterinary Hematology. Quinta edición. Lippincott, Williams and Wilkins, EUA. 2000.
101. Kraft W, Dürr UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Sexta edición. Schattauer, Alemania. 2005.
102. Simpson KW, Fyfe J, Cornetta A, Sachs A, Strauss-Ayali D, Lamb SV, Reimers TJ. Subnormal Concentrations of Serum Cobalamin (Vitamin B12) in Cats with Gastrointestinal Disease. *J Vet Intern Med*. 2001;15:26-32.
103. American Society for Testing and Materials. ASTM F2451 -05(2010) Standard Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage. <http://www.astm.org/Standards/F2451.htm>
104. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:705-713.
105. Hurtig MG, Buschmann MD, Fortier LA, et al. Preclinical studies for cartilage repair: recommendations from the International Cartilage Repair Society. *Cartilage*. 2011;2:137-152.
106. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16:105-115.



107. Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2006;19:142-146.
108. Hoemann C, Kandel R, Roberts S, et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. *Cartilage*. 2011;2:153-172.
109. Carrilero LP. Tratamiento de la artrofibrosis grado III de rodilla mediante debridamiento artroscópico y capsulotomía posterior. *Artroscopia*. 2009; 6(1):23-30.
110. Chen HH, Mack LM, Choi SY, Ontell M, Kochanek S, Clemens PR. . DNA from Both High-Capacity and First-Generation Adenoviral Vectors Remains Intact in Skeletal Muscle. *Hum. Gene Ther*. 1999;10:365-373
111. Russell WC. Update on Adenovirus and its Vectors. *J. Gen. Virol*. 2000;81:2573-2604.
112. Navarro V, Millecamps S, Geoffroy MC, Robert JJ, Valin A, Mallet J, Salle GL. Efficient Gene Transfer and Long-Term Expression in Neurons Using a Recombinant Adenovirus with a Neuron-Specific Promoter. *Gene Ther*. 1999; 6:1884-1892.

## CAPÍTULO XIV

### ANEXOS

#### 14.1 Medios de cultivo y soluciones

##### *Alginato al 1.5%*

Agregar 1.5% de alginato al medio para CMM, mezclar en un tubo estéril de 15 mL y calentar en baño María a 50°C, agitando en un mezclador de vórtice hasta que la mezcla se observe homogénea. Esterilizar con luz ultravioleta por 1 h dentro de la campana de flujo laminar y almacenar a 4°C.

##### *Colagenasa 0.1%*

Agregar 0.1 g de colagenasa en 100 mL de PBS 1X estéril. Esterilizar la solución en una unidad de filtración, colocarla en tubos de 50 mL y almacenarla a -20°C protegida de la luz.

##### *Medio condrogénico*

Suplementar el medio DMEM Advanced hasta tener una concentración final de: 5.33µg/mL de ácido linoléico, 1.25mg/mL de albúmina, 50µg/mL de L-ascórbico, 40µg/mL de L-prolina, 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina y 5% L-glutamina. El volumen obtenido se debe filtrar y se almacenar a 4°C.

##### *Medio para CMM y para HEK-293*

El medio DMEM se adiciona con 5% de L-glutamina y 1% del antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina); para las CMM el medio es suplementado con SFB al 10 % y para las HEK-293 al 4%. Después de filtrar se hacen alícuotas y se almacenan a 4°C.

## 14.2 Técnicas

### *Inclusión en parafina*

1. Realizar lavados del tejido con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Colocar las muestras en los casetes de inclusión.
2. Sumergir las muestras en acetonas graduales (70%, 90%, 100% y 100%) durante 20 min en cada solución para deshidratar el tejido.
3. Mantener el tejido durante 30 min en cada una de las siguientes soluciones: acetona/xilol, xilol 100% y xilol 100%.
4. Eliminar el xilol en la medida de lo posible y colocar la muestra en parafina líquida durante 60 min a 60°C. Repetir el proceso con parafina nueva.
5. Acomodar las muestras en los bloques de inclusión, embeberlas en parafina nueva, enfriar el bloque, desmontarlo y realizar los cortes de 4-5  $\mu$ m en el microtomo.
6. Adherir el tejido a los portaobjetos empleando el baño de flotación; dejar secar.
7. Los portaobjetos se colocan a 60°C por 15 min para eliminar la parafina, posteriormente pasan por xilol, etanol/xilol, etanol absoluto y etanol al 96° por 5 min y se enjuagan con agua destilada antes de ser teñidos.

### *Purificación adenoviral*

1. Someter la pastilla celular a tres ciclos de congelamiento a -80°C y descongelamiento en baño maría a 37°C. Centrifugar y tomar el sobrenadante.
2. Colocar en el tubo de polialómero 4 mL de CsCl<sub>2</sub> densidad 1.4; añadir lentamente 3 mL de CsCl<sub>2</sub> densidad 1.2, cuidando de no romper el gradiente.
3. Preparar los tubos necesarios para purificar el total del sobrenadante obtenido, teniendo en cuenta que se coloca un máximo de 2.5 mL por tubo.
4. Agregar el sobrenadante lentamente sobre gradiente; colocar encima 300  $\mu$ L de aceite mineral.
5. Colocar los tubos en sus chaquetas y pesar; retirar o añadir aceite mineral hasta haber igualado el peso de dos tubos.
6. Cumplido el tiempo, retirar cuidadosamente del tubo la banda azul-blانquecina con ayuda de una micropipeta.
7. Diluir la banda en un volumen similar de PBS 1X.



8. Depositar 6 mL de  $\text{CsCl}_2$  densidad 1.35 en un tubo de polialómero y lentamente colocar encima la banda recuperada, cuidando de que no se mezclen las soluciones.
9. Agregar finalmente 300  $\mu\text{L}$  de aceite mineral, colocar el tubo en la chaqueta e igualar su peso. Centrifugar a 35,000 rpm, 18 h, No Brake y  $4^\circ\text{C}$ .
10. En un matraz, preparar 3 L de buffer de diálisis (Tris 10 mM pH 8.0,  $\text{MgCl}_2$  2 mM y sacarosa 4%) y colocar la membrana de diálisis a hidratar en el buffer (en agitación y sobre una bandeja de hielo).
11. Terminada la centrifugación, recuperar banda azul-blانquecina e introducirla en la membrana con una jeringa, cuidando de no perforar.
12. Dializar durante 1 h y cambiar los 3 L de buffer. Repetir cambio de buffer y diálisis.
13. Cambiar nuevamente el buffer de diálisis por uno que contenga 10% de glicerol y dializar 1 h.
14. Recuperar el adenovirus de la membrana y colocarlo en crioviales. Almacenar a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### *Tinción con Hematoxilina & Eosina*

1. Hidratar con agua destilada durante 40 s.
2. Colocar el portaobjeto en solución de hematoxilina por 2 min. Realizar dos lavados con agua de la llave.
3. Realizar una inmersión rápida en alcohol ácido; lavar dos veces con agua de la llave y una tercera vez con agua destilada.
4. Realizar dos inmersiones rápidas en agua amoniaca y enjuagar con agua de la llave y agua destilada.
5. Hacer 6 inmersiones rápidas en eosina.
6. Deshidratar y aclarar durante 15 s en cada una de las siguientes soluciones: alcohol al 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol y 2 cambios de xilol. Montar con resina.

#### *Tinción con Tricrómico de Gomori*

1. Hidratar con agua destilada durante 40 s.
2. Teñir núcleos con hematoxilina por 10 min.
3. Lavar con agua corriente por 6 min (el primer cambio se desecha). Enjuagar con agua destilada hasta que deje de salir el color de la hematoxilina.

4. Teñir en la solución de Gomori por 5 min y lavar con agua destilada hasta que el color deje de desprenderse.
5. Realizar 3 inmersiones en el ácido acético acuso al 1%.
6. Deshidratar y aclarar durante 15 s en cada una de las siguientes soluciones: etanol al 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol y 2 cambios de xilol. Montar con resina.

#### *Transducción de CMM*

1. Realizar los cálculos necesarios para transducir a una MOI de 100.
2. Descongelar el vial que contiene el vector en hielo hasta el momento de ser utilizado.
3. Diluir la cantidad necesaria del vector en medio para CMM sin SFB (la cantidad mínima de medio para que la monocapa celular alcance a cubrirse).
4. Eliminar el medio con el que las células están cultivadas y lavar con PBS 1X dos veces.
5. Agregar a cada cultivo la cantidad necesaria del vector resuspendido e incubar durante 3 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
6. Completar con medio para CMM el volumen normal de trabajo y colocar nuevamente en la incubadora.